

Cellulosetrischwefelsäureester
- ein spermizider Wirkstoff?

Untersuchungen zur kontrazeptiven Wirkung
von Cellulosetrischwefelsäureester
- deklarierter Wirkstoff
des Vaginalovulums a-gen 53

Ursula Loos

Disbui. München

1988

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Cellulosetrischwefelsäureester - ein spermizider Wirkstoff?

Untersuchungen zur kontrazeptiven Wirkung von
Cellulosetrischwefelsäureester - deklarierter Wirkstoff des
Vaginalovulums a-gen 53

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ursula Loos
aus
Schnaittach

1987

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. rer. nat. Dr. med. habil. E. Töpfer-Petersen

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 02. 1988

1	Einleitung	1
2	GRUNDLAGEN	1
2.1	Statische Voraussetzungen einer Konstruktion vor Beginn der FE	3
2.2	Einflusslinien zur Beanspruchungsbestimmung	3
2.3	Statische Systeme	3
2.3.1	Einflusslinien	3
2.3.2	Einflusslinien	3
2.3.3	Einflusslinien	3
2.3.4	Einflusslinien	3
2.3.5	Einflusslinien	3
2.3.6	Einflusslinien	3
2.3.7	Einflusslinien	3
2.3.8	Einflusslinien	3
2.3.9	Einflusslinien	3
2.3.10	Einflusslinien	3
2.3.11	Einflusslinien	3
2.3.12	Einflusslinien	3
2.3.13	Einflusslinien	3
2.3.14	Einflusslinien	3
2.3.15	Einflusslinien	3
2.3.16	Einflusslinien	3
2.3.17	Einflusslinien	3
2.3.18	Einflusslinien	3
2.3.19	Einflusslinien	3
2.3.20	Einflusslinien	3
2.3.21	Einflusslinien	3
2.3.22	Einflusslinien	3
2.3.23	Einflusslinien	3
2.3.24	Einflusslinien	3
2.3.25	Einflusslinien	3
2.3.26	Einflusslinien	3
2.3.27	Einflusslinien	3
2.3.28	Einflusslinien	3
2.3.29	Einflusslinien	3
2.3.30	Einflusslinien	3
2.3.31	Einflusslinien	3
2.3.32	Einflusslinien	3
2.3.33	Einflusslinien	3
2.3.34	Einflusslinien	3
2.3.35	Einflusslinien	3
2.3.36	Einflusslinien	3
2.3.37	Einflusslinien	3
2.3.38	Einflusslinien	3
2.3.39	Einflusslinien	3
2.3.40	Einflusslinien	3
2.3.41	Einflusslinien	3
2.3.42	Einflusslinien	3
2.3.43	Einflusslinien	3
2.3.44	Einflusslinien	3
2.3.45	Einflusslinien	3
2.3.46	Einflusslinien	3
2.3.47	Einflusslinien	3
2.3.48	Einflusslinien	3
2.3.49	Einflusslinien	3
2.3.50	Einflusslinien	3
2.3.51	Einflusslinien	3
2.3.52	Einflusslinien	3
2.3.53	Einflusslinien	3
2.3.54	Einflusslinien	3
2.3.55	Einflusslinien	3
2.3.56	Einflusslinien	3
2.3.57	Einflusslinien	3
2.3.58	Einflusslinien	3
2.3.59	Einflusslinien	3
2.3.60	Einflusslinien	3
2.3.61	Einflusslinien	3
2.3.62	Einflusslinien	3
2.3.63	Einflusslinien	3
2.3.64	Einflusslinien	3
2.3.65	Einflusslinien	3
2.3.66	Einflusslinien	3
2.3.67	Einflusslinien	3
2.3.68	Einflusslinien	3
2.3.69	Einflusslinien	3
2.3.70	Einflusslinien	3
2.3.71	Einflusslinien	3
2.3.72	Einflusslinien	3
2.3.73	Einflusslinien	3
2.3.74	Einflusslinien	3
2.3.75	Einflusslinien	3
2.3.76	Einflusslinien	3
2.3.77	Einflusslinien	3
2.3.78	Einflusslinien	3
2.3.79	Einflusslinien	3
2.3.80	Einflusslinien	3
2.3.81	Einflusslinien	3
2.3.82	Einflusslinien	3
2.3.83	Einflusslinien	3
2.3.84	Einflusslinien	3
2.3.85	Einflusslinien	3
2.3.86	Einflusslinien	3
2.3.87	Einflusslinien	3
2.3.88	Einflusslinien	3
2.3.89	Einflusslinien	3
2.3.90	Einflusslinien	3
2.3.91	Einflusslinien	3
2.3.92	Einflusslinien	3
2.3.93	Einflusslinien	3
2.3.94	Einflusslinien	3
2.3.95	Einflusslinien	3
2.3.96	Einflusslinien	3
2.3.97	Einflusslinien	3
2.3.98	Einflusslinien	3
2.3.99	Einflusslinien	3
2.3.100	Einflusslinien	3

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	GRUNDLAGEN	4
2.1.	Biologische Voraussetzungen einer Konzeption von Seiten der Frau	4
2.2.	Möglichkeiten der Konzeptionsverhütung durch die Frau	5
2.3.	Kontrazeptive Methoden	5
2.3.1.	Hormonelle Kontrazeption	6
2.3.2.	Mechanische Methoden	7
2.3.3.	Intravaginal anzuwendende chemische Verhütungsmittel	8
2.3.3.1.	Kontrazeptiva mit dem Wirkstoff Nonylphenoxypolyäthoxyäthanol = Nonoxinol	10
2.3.3.2.	Vergleichende Untersuchungen neuer chemischer lokaler Spermizide und Nonoxinol	11
2.3.3.3.	Kontrazeptivum mit dem Wirkstoff Natrium-Cellulosetrisulfat- ester (CTSA)	13
2.3.4.	Operative Sterilisation als irreversible Methode	17
2.4.	Biologische Voraussetzungen einer Konzeption von Seiten des Mannes	18
2.4.1.	Aufbau des Spermatozoons	18
2.4.2.	Wichtigste Fertilitätsparameter des Spermatozoons	19
2.4.2.1.	Spermatozoenmorphologie	19
2.4.2.2.	Spermatozoenmotilität	20
2.4.2.3.	Spermatozoendichte	20

2.4.3.	Voraussetzungen zur Befruchtungsfähigkeit des Spermatozoons	21
2.4.3.1.	Kapazitation	21
2.4.3.2.	Hyperaktivtion	23
2.4.3.3.	Akrosomreaktion	23
2.4.4.	Befruchtung	26
2.5.	Möglichkeiten der Konzeptionsverhütung durch den Mann	27
2.6.	Kontrazeptive Methoden	27
2.6.1.	Hemmung der Spermatogenese und der Spermatozoenreifung	28
2.6.2.	Hemmung der Spermatozoenkapazitation bzw. der Penetrationsenzyme	30
2.6.3.	Unterbrechung der ableitenden Samenwege und damit des Spermatozoentransportes	31
2.7.	Sicherheit der beschriebenen kontrazeptiven Methoden	31
3.	EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	33
3.1.	Untersuchungsmaterial	33
3.1.1.	Ejakulate	33
3.1.2.	Lösungen	33
3.1.2.1.	Zur Immunfluoreszenz verwendete Lösungen	33
3.1.2.2.	Bei Motilitätsbeurteilung und Triple-Stain-Technik verwendete Lösungen	34
3.1.3.	CTSA	35

3.2.	Methoden	36
3.2.1.	Versuchsanordnung zur Beurteilung der Akrosinfreisetzung und der äußeren akrosomalen Membran mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz	36
3.2.1.1.	Prinzip der Immunfluoreszenz	36
3.2.1.2.	Versuchsziel	37
3.2.1.3.	Vorbereitung des Ejakulats	38
3.2.1.4.	Versuchsdurchführung	38
3.2.1.5.	Auswertung	39
3.2.2.	Versuchsanordnung zur Motilitätsmessung mit Hilfe der Dunkelfeldmethode	40
3.2.2.1.	Vorbereitung des Ejakulats	40
3.2.2.2.	Versuchsdurchführung	41
3.2.2.3.	Auswertung	42
3.2.3.	Versuchsanordnung zur Beurteilung der Akrosomreaktion mit Hilfe der Triple-Stain-Technik	43
3.2.3.1.	Prinzip der Färbung	43
3.2.3.2.	Vorbereitung des Ejakulats	43
3.2.3.3.	Durchführung der Färbung	44
3.2.3.4.	Auswertung	45
4.	VERSUCHSERGEBNISSE	47
4.1.	Immunfluoreszenz	47
4.1.1.	Untersuchung zur Akrosinfreisetzung mittels α -Akrosin-Antikörper	47
4.1.1.1.	Ergebnisse der Spendergruppe	47
4.1.1.2.	Ergebnisse der Patientengruppe	52
4.1.2.	Untersuchung zur Integrität der äußeren akrosomalen Membran der Spermatozoen mittels OAM-Antikörper	58

4.2.	Spermatozoenmotilität	60
4.2.1.	Kontrollproben	62
4.2.2.	Testproben	64
4.3.	Triple-Stain-Technik	72
5.	DISKUSSION	76
5.1.	Allgemeines	76
5.1.1.	Spermatozoenmigration	76
5.1.2.	Spermizide	77
5.1.3.	Cellulosetrischwefelsäureester, der deklarierte Wirkstoff des Vaginalovulums a-gen 53	78
5.2.	Eigene Untersuchungen	79
5.3.	Untersuchungen über die spermizide Wirksamkeit von a-gen 53 und seinem deklarierten Wirkstoff CTSA (Schill W.-B. und Mitarbeiter, 1985)	80
5.4.	Schlußfolgerung	82
6.	ZUSAMMENFASSUNG	85
7.	LITERATURVERZEICHNIS	87
8.	DANKSAGUNG	102
9.	LEBENS LAUF	103

1. EINLEITUNG

Empfängnisverhütung ist ein Problem, das heute in jeder Familie in den Vordergrund gerückt ist. In der gynäkologischen Praxis gehört die Aufklärung über Empfängnisverhütung zur Routine. Aus medizinischer Sicht kontraindizierte Schwangerschaften, bewußte Familienplanung, die Vermeidung ungewollter Schwangerschaften bei jugendlichen und sozial schlecht gestellten Paaren machen eine zuverlässige Antikonception nötig. Neben absoluter Sicherheit als Hauptkriterium werden heute noch weitere Anforderungen an ein gutes Antikonzeptium gestellt. Dazu gehören einfache Anwendungsweise, gute Verträglichkeit und Unschädlichkeit, auch bei längerer Anwendung.

Die bisher bekannten und gebräuchlichen Methoden zur Empfängnisverhütung beschränken sich bis auf wenige Ausnahmen auf die Beeinflussung der Fertilität der Frau. Für eine reversible, auf bestimmte Zeit befristete Verhütung finden hormonelle, mechanische und lokal wirksame chemische Methoden Anwendung. Die Bedeutung lokaler intravaginaler Antikonception geht bis ins Altertum zurück.

SORANUS, einer der berühmtesten Gynäkologen des Altertums studierte in Alexandria und praktizierte in Rom unter den Kaisern Trajan und Hadrian (53). Bei ihm kann man nachlesen:

"Ferner verhindern die Conception Inunctionen des Muttermundes mit allem Del oder Honig oder Ebernharz oder Opobalsamum entweder allein oder mit Bleiweiß verbunden, oder mit Salbe, welche in Myrthenöl und Bleiweiß bereitet ist, oder mit Alaun, welches ebenfalls vor dem Coitus zu befeuchten ist, oder Galbanum in Wein. Wirksam ist auch weiche Wolle in den Muttermund eingebracht oder vor dem Coitus der Gebrauch von Mutterzäpfchen, welche zusammenziehen und verschließen. Denn wenn derartige Mittel abstringierend und kühlend wirken, verschließen sie den Muttermund vor dem Augenblicke des Beischlafs und verhindern den Eintritt des Samens in die Uterushöhle; wirken sie dazu noch reizend, so verhindern sie nicht nur das Verbleiben des Samens in der Uterushöhle, sondern ziehen sogar noch eine andere Flüssigkeit auf derselben."



Des weiteren empfahl er, Wattetampons mit Gerbstoffen, Wein oder Apfelsäure zu tränken und vor dem Verkehr in die Vagina einzuführen (53).

Heute sind intravaginal wirkende Kontrazeptiva in Form von Ovula, Tabletten, Cremes und Sprays im Handel.

Als Wirksubstanzen werden am häufigsten Nonoxinol (Antibion-Vaginaltabletten, Delfen-Creme, Delfen-Vaginalschaum, Patentex oval-Schaumovulum) und Octoxinol (Ortho-Creme, Ortho Gynol-Vaginalgel) verwendet.

Diese sind oberflächenaktive Spermizide. Ihre Wirkung beruht auf einer Reduzierung der Oberflächenspannung und einer direkten Einwirkung auf die Zellmembran der Spermatozoen (63). Dadurch kommt es zu sofortiger Immobilisation und Abtötung der Spermatozoen (63).

Eine andere neuartige Wirkungsgrundlage sollte das von der Dr. Herbrand KG entwickelte a-gen 53 aufweisen. Bei a-gen 53 -im Ausland unter der Bezeichnung Syn-A-Gen vertrieben- handelt es sich um ein Antikonzipiens in Form von Vaginalsuppositorien a' 2,5 Gramm, die als deklarierten Wirkstoff je 0,1 Gramm Natrium-Cellulose-trischwefelsäureester (CTSA) enthalten.

Dieser Wirkstoff wird als "irreversibler Enzymhemmer" bezeichnet (23), der sowohl lebensnotwendige Stoffwechselvorgänge des Spermatozoons blockiert als auch die zur Befruchtung notwendigen akrosomalen Enzyme hemmt. Durch Membranveränderungen würde die Fructoseaufnahme verhindert und sofortige Immobilität der Spermatozoen erreicht werden. Eine Hemmung der Hyaluronidase im Akrosom des Spermatozoons würde das Spermatozoon zur Befruchtung untauglich machen, da die Freisetzung dieses Enzyms für die Penetration der Eizelle unerlässlich ist (11).

Zweifel an dieser angeblichen Blockade der Penetrationsenzyme im intakten Akrosom des Spermatozoons entstanden schon deshalb, da CTSA mit seiner Molekülgröße von 68 bis zu 2000 kdal Molekulargewicht nicht in der Lage sein dürfte, die intakten Akrosomen zu durchdringen (84).

Da sich generell die Frage nach der Spermizidität von CTSA stellte, wurden die vorliegende Arbeit mit der Reinsubstanz CTSA und parallel dazu Untersuchungen sowohl mit der Reinsubstanz als auch dem Vaginalovulum a-gen 53 (84) durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe spezieller Untersuchungen zu prüfen, ob der Wirkstoff CTSA tatsächlich eine spermizide Wirkung im Sinne einer sofortigen Immobilisierung und Abtötung der Spermatozoen aufweist und die ihm nachgesagte Blockade der Fruktolyse und der akrosomalen Enzyme bewirkt. Läßt sich eine spermizide Wirkung auf Motilität, Morphologie und das akrosomale Penetrationsenzym Akrosin feststellen?

Die Hemmung der Fruktolyse führt zu einer Immobilisation und damit einem Absterben der Spermatozoen und läßt sich durch Motilitätsuntersuchungen nachweisen. Die Beurteilung der Motilität umfaßt die prozentuale Anzahl der vorwärts beweglichen Spermatozoen, ihre Geschwindigkeit und das Auftreten der Wiplash-Bewegung (1). Diese Untersuchungen wurden nach der modifizierten Dunkelfeldmethode nach OVERSTREET et al.(66) durchgeführt.

Mit Hilfe der Triple-Stain-Technik konnte die morphologische Integrität der Spermatozoen und ihr jeweiliger akrosomaler Reaktionszustand aufgezeigt werden. Durch die indirekte Immunfluoreszenz wurden die morphologische Beschaffenheit der akrosomalen Region und die mögliche Akrosinfreisetzung beurteilt.

Die Triple-Stain-Technik ist eine Drei-Phasen-Färbemethode. Sie wurde 1981 von TALBOT und CHACON (92) beschrieben und basiert auf drei verschiedenen Färbeprozessen. Das Akrosom kann damit anhand seiner Färbung auf seinen Reaktionszustand geprüft werden.

Mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich nach Zugabe von Antikörpern gegen das Penetrationsenzym Akrosin beziehungsweise Antikörpern gegen die äußere akrosomale Membran die Akrosinfreisetzung und die Membranveränderungen beurteilen.

2. GRUNDLAGEN

Konzeption ist die zur Befruchtung führende Kohabitation. Befruchtung bedeutet die Vereinigung zweier gegengeschlechtlicher Keimzellen und die Bildung einer Zygote.

2.1. Biologische Voraussetzungen einer Konzeption von Seiten der Frau

Während der Geschlechtsreife (ca. 18. - 45. Lebensjahr) kommt es in den Ovarien der Frau durch Einflüsse der Hormone Östrogen und Progesteron zu Follikelreifung und anschließender Ovulation. Hierbei wird die Oozyte aus dem Follikel ausgestoßen. Sie ist bei der Ausstoßung von einer großen Zahl von Cumulus oophorus-Zellen umgeben. Diese bilden die Corona radiata und enthalten als interzelluläre Kittsubstanz Hyaluronsäure. Als weitere Hüllen folgen nach innen die Zona pellucida, die aus Glykoproteinen besteht und das Oolemm. Von besonderer Bedeutung ist die Zona pellucida. Von ihr nimmt man an, daß sie spermatozoenbindende Stellen, sog. Spermatozoenrezeptoren enthält (60).

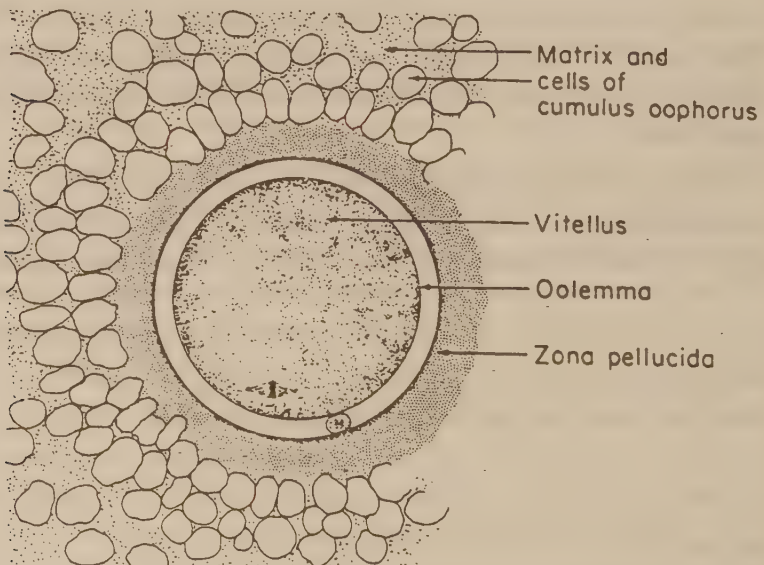


Abbildung 1: Aufbau der Eihüllen (nach Bedford, 1983)

Die ausgestoßene Eizelle wird von der Tube aufgenommen. Sie ist höchstens 6 - 24 Stunden befruchtungsfähig. Ihre Befruchtung erfolgt in der Ampulle der Tube. Voraussetzung für die Anwesenheit der Spermatozoen in der Ampulle ist die Durchgängigkeit des Cervixschleims. Sie ist ebenso wie die weitere Wanderung des befruchteten Eis durch die Tube und sein Übertritt in das Cavum uteri hormonell abhängig. Am sechsten Tag post ovulationem erfolgt die Implantation in der Schleimhaut des Corpus uteri.

2.2. Möglichkeiten der Konzeptionsverhütung durch die Frau

Betrachtet man die Voraussetzungen, die eine Konzeption erst möglich machen, werden die für Eingriffe zugänglichen Stellen deutlich:

- Hemmung der Ovulation
- Störung der Corpus-Luteum-Funktion
- Störung von Aufnahme und Transport der ausgestoßenen Oozyte in die Ampulle der Tube, den Ort der Befruchtung
- Unterbrechung des Eileiters und damit des Weitertransports des befruchteten Eis
- Verhinderung der Einnistung des befruchteten Eis im Corpus uteri
- Erschwerung bzw. Verhinderung der Spermatozoenaszension durch die Cervix

2.3. Kontrazeptive Methoden

Die wesentliche Grundlage für die Beurteilung von Kontrazeptiva sind ihre Wirksamkeit, ihre Unschädlichkeit und ihre Verträglichkeit.

Empfängnisverhütende Methoden ohne Beeinflussung des weiblichen Organismus und ohne Manipulation am weiblichen Genitale sind die periodische Enthaltbarkeit (Kalendermethode nach Knaus-Ogino) und die Temperaturmethode.

Die Kalendermethode beruht auf der sorgfältigen Aufzeichnung der Cyclen über mindestens zwölf Monate, die als Grundlage für die Berechnung fertiler und infertiler Tage dient. Wegen der stetigen Möglichkeit von Cyclusverschiebungen ist die Zuverlässigkeit dieser Methode nur gering.

Die Bestimmung der fruchtbaren und unfruchtbaren Tage mit Hilfe der Basaltemperaturmessung gilt dagegen als relativ sicher. Zum Zeitpunkt der Ovulation steigt die Temperatur innerhalb von 48 Stunden und bleibt auf einem um ca. $0,2^{\circ}\text{C}$ höheren Level als an den Tagen vor der Ovulation. Die Zeit vom dritten Tag der hyperthermen Phase bis zur Menstruation gilt als sicher unfruchtbar.

2.3.1. Hormonelle Kontrazeption

Vielseitige Angriffspunkte zur Verhinderung einer Konzeption zeigen hormonelle Kontrazeptiva.

Am weitesten verbreitet sind die ovulationshemmenden Präparate. Sie enthalten Gestagene und Östrogene kombiniert (Pincus-Pille) oder in Sequenz (Sequentialpräparat).

Von 20 Millionen fertilen Frauen in der Bundesrepublik verwendeten 1974 circa vier Millionen die "Pille" zur Empfängnisverhütung (72).

Die Wirkungsweise besteht hauptsächlich in einer Hemmung der Ovulation. Sollte diese dennoch erfolgt sein und eine Eizelle ausgestoßen worden sein, kommt es durch Änderungen der Tubenbeweglichkeit zu Behinderungen in der Eiaufnahme und im Eitransport. Die zum Ovulationszeitpunkt auftretende Viskositätsänderung des Cervixschleims wird verhindert und ein Eindringen von Samenzellen in die Cervix erschwert. Zusätzlich resultiert eine Atrophie der Gebärmutter Schleimhaut, die eine eventuelle Nidation einer Eizelle unmöglich macht.

Da Östrogene und Gestagene viele Organfunktionen beeinflussen, kann die hormonelle Kontrazeption vielerlei Nebenwirkungen mit sich bringen, die zum Absetzen der "Pille" zwingen können. Frauen mit bestimmten vorbestehenden Erkrankungen, die durch den hormonellen Einfluß verschlimmert werden könnten, sind von der hormonellen Kontrazeption von vornherein auszuschließen.

Hormonelle Kontrazeption ohne Ovulationshemmung erreicht man mit der sog. Minipille. Sie enthält ein synthetisches Gestagen in niedriger Dosis. Ihre Wirkung besteht hauptsächlich in einer Verhinderung der Spermatozoenaszension in das Cavum uteri durch die Beeinflussung des Cervixschleims. Die Zuverlässigkeit dieser Methode ist jedoch strikt an die täglich gleiche Einnahmezeit gebunden. Der Vorteil liegt im Wegfallen der östrogenbedingten Nebenwirkungen der herkömmlichen Ovulationshemmer.

Sollte die Konzeption bereits erfolgt sein, kann die Schwangerschaft durch Applikation hoher Östrogendosen innerhalb von 48 Stunden verhindert werden (27,62).

Die Wirkungsweise dieser Postkoitalpille beruht auf einer veränderten Transportgeschwindigkeit des Eis durch die Tube und einer Störung des Implantationsvorgangs. Die Nidation des Eis wird verhindert. Nachteil dieser Methode sind die starken Nebenwirkungen, die durch die große Östrogendosis auftreten (88).

2.3.2. Mechanische Methoden

Eine Alternative zur "Pille" sind nichthormonale Kontrazeptiva. Bekannt sind die mechanischen Verhütungsmittel Intrauterinpressar (IUP), das Scheidendiaphragma und die Portiokappe.

Intrauterinpressare gibt es in verschiedenen Ausführungen (93). Das herkömmliche IUP ist aus gewebefreundlichem Plastik. Verschiedene Wirkungsweisen werden diskutiert. So soll der Eitransport von der Tube in den Uterus rapide beschleunigt werden (58,59). RABE und RUNNEBAUM (71) vermuten durch Anwesenheit des IUP Veränderungen der Fermentaktivität und des Elektrolytmilieus.

Zur Verfügung stehen auch kupferhaltige und progesteronhaltige Intrauterinpressare, die durch die ständige Abgabe von Kupferionen bzw. Progesteron die Uterusschleimhaut für die Einnistung eines Eis ungeeignet machen.

Der Nachteil des IUP liegt im häufigen Auftreten von Beschwerden. Sie reichen von Unterbauschmerzen, verstärkte Menstruation und Blutungsstörungen bis zu Entzündungen im Adnexitisbereich und Uterusperforationen. Außerdem besteht ein erhöhtes Risiko für eine Eileiterschwangerschaft.

Das Scheidendiaphragma ist eine gewölbte Gummischeibe, die vor dem Verkehr in die Scheide eingeführt wird. Sie schließt die Cervix aber nicht völlig ab, so daß ein Eindringen von Spermatozoen in die Cervix nicht sicher verhindert werden kann. Die Sicherheit dieser Methode ist stark von der richtigen Handhabung abhängig.

Die Portiokappe ist aus Gummi oder Plastik und wird über die Portio gestülpt. Sie wird postmenstruell aufgesetzt und schließt die Vagina gegen den Uterus ab. Einige Tage vor der nächsten Menstruation wird sie abgenommen. Durch Abschließen gegen den Uterus verhindert sie einerseits eine Berührung der Spermatozoen mit der Portio und ein Eindringen in den Cervikalkanal. Der zweite Effekt liegt im Zurückhalten der Sekretionen, die bei sexueller Erregung aus der Cervix abgesondert werden. Das Vaginalsekret, das mit seinem üblichen pH-Wert von 4-5 spermatozoenschädigend wirkt, wird durch die Beimischung der Cervixabsonderungen neutralisiert und erreicht einen spermatozoenfeindlichen pH von 7. Ein mechanischer Verschuß der Cervix dient der Erhaltung der natürlichen Spermizidität des Vaginalmilieus (19).

2.3.3. Intravaginal anzuwendende chemische Verhütungsmittel

Schon früher wurden Hausmittel angewendet, die, in die Scheide eingeführt, eine Empfängnis verhüten sollten. Angeblich wirksam waren Zitronenscheiben oder Reis-schleim mit Kochsalz (27).

Heutige intravaginale Kontrazeptiva sind in Form von Tabletten, Schaumtabletten, Zäpfchen, Ovula, Cremes und Sprays im Handel und enthalten spermizid wirkende Stoffe wie Chinin (Si O-Sicherheitsovale), Dihydrocuprein (Confidol-Creme) und Hydroxychinolinsulfat (Semori-Schaumtablette).

Die am häufigsten verwendeten Spermizide sind jedoch Octoxinol (Ortho-Creme, Ortho-Gynol-Gel) und Nonoxinol (Antibion-Vaginaltabletten, Contra-E Vaginalovulum, Delfen-Creme, Delfen-Vaginal-Schaum, Patentex-Gel, Patentex-Schaum-Spray, Patentex-oval)(27,30).

Die Verwendung dieser Art von Kontrazeptiva bietet mehrere Vorteile:

- die kontrazeptive Wirkung tritt fast unmittelbar ein
- durch die lokale Applikation bleibt der Hormonhaushalt des Organismus unberührt
- die Antikonception ist zeitlich beschränkt, der Zeitpunkt wird selbst gewählt
- es gibt keine gesundheitlichen Einschränkungen
- die gleichzeitig bakterizide Wirkung der Spermizide gilt als Vorbeugung gegen venerische Erkrankungen
- die intravaginale Applikation ist leicht durchzuführen

Diese Kontrazeptiva können allein angewendet oder mit mechanischen Methoden kombiniert werden (8,25,29).

Kombination mechanischer und chemischer Methoden:

Die meisten Marken Kondome sind heute mit einer spermiziden Substanz beschichtet. Die häufigsten Versager bei Kondombenutzung beruhen auf Anwendungsfehlern, zum Beispiel dem verspäteten Zurückziehen des bereits erschlafften Penis. Dadurch kommt es zu einem Auslaufen des Spermas in die Scheide.

Ist das Kondom mit spermiziden Substanzen beschichtet oder wendet die Partnerin zusätzlich intravaginale Spermizide an, verringert sich das Risiko der Konzeption (70). Ausdrücklich empfohlen wird die zusätzliche Verwendung von spermiziden vaginalen Verhütungsmitteln bei Gebrauch des Scheidendiaphragmas. Es darf frühestens sechs Stunden nach Verkehr, sollte aber spätestens 24 Stunden nach Einlegen aus der Vagina entfernt werden. Da Spermatozoen bis zu zwei Tagen lebensfähig sind, kann die Sicherheit dieser Methode durch Kombination mit Spermiziden wesentlich erhöht werden (88).

2.3.3.1. Kontrazeptiva mit dem Wirkstoff Nonylphenoxypolyäthoxyäthanol = Nonoxinol

Nonoxinol ist seit den 50er Jahren bekannt und gilt als eines der wirksamsten Spermizide. Das bei uns am häufigsten verwendete Präparat mit diesem Wirkstoff ist das Schaumovulum Patentex oval.

Die Wirkung des Nonoxinol beruht auf seiner Oberflächenaktivität. Eine Reduzierung der Oberflächenspannung und die direkte Einwirkung auf die Zellmembran der Spermatozoen bedingen eine irreversible Motilitätshemmung. Ein generalisierter Plasmamembranverlust und ein Verlust der akrosomalen Membranen hat den Austritt der Penetrationsenzyme zur Folge (63, 82).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ultrastruktur menschlicher Spermatozoen zeigen nach deren Behandlung mit Nonoxinol-9 in Reinform beziehungsweise mit dem Vaginalovulum Patentex oval bedeutende Veränderungen auf (82). Die Plasmamembranen sind vollständig entfernt, die akrosomalen Membranen fehlen, die Kernmembran weist Schwellungen und Brüche auf. Es werden Anzeichen von Kerndekondensation beobachtet. Die Mitochondrienmembran erscheint einschichtig, das Mitochondrieninnere ist leer oder enthält feine Granulationen; die normalen Cristae fehlen.

Diese strukturellen Membranveränderungen treten bereits bei einer Nonoxinol-Konzentration von 0,05% auf. Diese Konzentration ist 25 mal geringer als die mit dem Vaginalovulum erreichte Endkonzentration von 1,25% in der Vagina (82).

Auch Untersuchungen bezüglich der Freisetzung von Akrosin und seiner Aktivität wurden durchgeführt (63). Eine Behandlung der Spermatozoen mit Nonoxinol in der Konzentration von 0,01% -1% ergab einen 90%igen Verlust der im Akrosom nativer Spermatozoen vorhandenen proteolytischen Aktivität ins umgebende Medium.

Die Aktivität des freigesetzten Enzyms wurde durch niedrige Konzentrationen (0,001%-0,1%) stimuliert, durch höhere Konzentrationen (1%) gehemmt. Die Konzentration von 1% entspricht auch der lokalen vaginalen Konzentration von Nonoxinol. Eine unspezifische Proteolyse des Vaginalepithels durch die freigesetzten Enzyme findet nicht statt (63).

Üblicherweise ist Nonoxinol in Trägerstoffe eingebettet, die zusätzlich Substanzen enthalten, die zu einer schnellen Emulsionsbildung mit dem Vaginalsekret führen. So wird der Wirkstoff gleichmässig über die Scheide verteilt. Durch die gelösten und oftmals schäumenden Substanzen resultiert ein mechanischer Verschluss des äußeren Muttermundes.

Die Vaginalovula von Patentex oval schmelzen bei Körperwärme und entwickeln einen feinen viskösen Schaum. Der Schaum verteilt sich mit dem spermiziden Wirkstoff gleichmässig in der Vagina und bildet vor dem äußeren Muttermund eine Barriere. Wie in mehreren Untersuchungen nachgewiesen wurde, ist dieser Schaum für Spermatozoen undurchdringbar (9, 39, 72).

Untersuchungen mit dem Sims-Hühner-Test ergaben nach Anwendung von Patentex oval nie Spermatozoen in der Cervix, nur tote Spermatozoen in der Vagina und daneben oft zu 50% ein "Verschwinden oder ein Auflösen der Spermien" (40). Dieses letzte Phänomen konnte in 70% aller untersuchten Fälle nachgewiesen werden (40).

2.3.3.2. Vergleichende Untersuchungen neuer chemischer, lokal wirksamer Spermizide und Nonoxinol

Neueste Untersuchungen wurden in der Schweiz mit spermizid-getränkten Kunststofftampons durchgeführt (45). Man verwendete Nonoxinol-9 (sog. Today-Tampon) beziehungsweise Benzalkoniumchlorid (sog. Benzaltex-Tampon).

Zur spermiziden Wirkung des Nonoxinol bzw. des Benzalkoniumchlorids addieren sich zusätzlich das Aufsaugen des Spermas durch Kapillarkräfte im Schwamm und die mechanische Abdeckung des Zervikalkanals durch den Tampon.

Die Vorteile solcher Schwämme vereinen die Vorteile der Spermizide und des mechanischen Schutzes. Nachteil ist die oft störende Empfindung des Fremdkörpers durch Patientin oder Partner. Außerdem ist bei einer Retroflexio uteri die optimale Lage des Tampons nicht mehr gewährleistet. Der Tampon kann in das erweiterte hintere Scheidengewölbe gelangen und die mechanische Schutzwirkung ist aufgehoben.

Die Anwendungsdauer ist auf 24 Stunden beschränkt, da sonst die Gefahr eines Toxic-Shock-Syndroms nicht ausgeschlossen werden kann.

Zur Zuverlässigkeit kann noch keine repräsentative Aussage gemacht werden, da die Studie noch nicht vollständig ausgewertet ist. Nach den bereits zur Verfügung stehenden Zahlen fallen beide Tampons in die Kategorie der Methoden mittlerer Zuverlässigkeit (Pearl-Index 5-10) beziehungsweise geringer Zuverlässigkeit (Pearl-Index 15 -30) (27, 45). Der Today-Tampon liegt mit einem Pearl-Index von 10,4 unter dem dem Wert des Benzaltex-Tampons (Pearl-Index 15).

Eine Alternative zu Nonoxinol-9 wird in der Volksrepublik China benutzt. Es handelt sich um ein Alkylphenoxypolyethoxyethanol, kurz als "741" bezeichnet, das als Ersatz für Nonoxinol dient (99).

Es ist ebenfalls ein nichtionischer oberflächenaktiver Wirkstoff, der zum Verlust der Membranstrukturen des Spermatozoons führt. Sowohl die spermizide Aktivität als auch die Toxizität von "741" und Nonoxinol sind nach den Untersuchungen von XIAO et al. (1986) gleichzusetzen. Der Vorteil von "741" liegt im geringen Kostenaufwand bei der Herstellung, da die Synthese von "741" auf einem Nebenprodukt der Erdölindustrie basiert.

VICKERY et al. (95) verglichen die spermizide bzw. spermatozoenimmobilisierende Fähigkeit eines Imidazoloxalates (als RS-37 367 bezeichnet) im Verhältnis zu Nonoxinol-9. Die Versuche wurden vor allem an Hundesperma durchgeführt.

Hierbei war bei Behandlung mit RS-37 367 eine 25-50 mal höhere spermizide Wirksamkeit festzustellen als bei Verwendung von Nonoxinol. Sofortige Spermatozoenimmobilisation konnte durch 125 µg/ml Nonoxinol (= 0,0125%) erreicht werden, bei Verwendung von RS-37 367 waren nur 5,0 µg/ml (=0,0005%) nötig.

Bei beiden Substanzen waren Unterschiede in der Wirkweise festzustellen. So führte RS-37 367 zu einer Vesikulation der Plasma- und der äußeren akrosomalen Membran und zu einer Ausbreitung der akrosomalen Inhaltsstoffe, bei Nonoxinol dagegen resultierte ein generalisierter Membranverlust (vergleiche auch 82).

Erstaunlich waren die Ergebnisse bei den Untersuchungen zur Reversibilität des spermiziden Effekts. Circa 15-minütiges Aussetzen von Spermatozoen in Konzentrationen von RS-37 367, die nicht sofort immobilisierten, bewirkten eine stetig fortschreitende Immobilisation der Spermatozoen, die auch durch anschließendes sorgfältiges Waschen nicht verhindert wurde.

Im Gegensatz dazu kehrte die Motilität der Spermatozoen, die nach vorübergehendem Aussetzen in Nonoxinol ebenfalls sorgfältig gewaschen wurden, zum Ausgangsniveau zurück. Die Motilitätsbeobachtungen wurden 30 und 60 Minuten nach dem Kontakt der Spermatozoen mit den Spermiziden durchgeführt.

Für die sofortige Immobilisierung menschlicher Spermatozoen war eine RS-37 367 Konzentration von 26,3 µg/ml nötig. Für Nonoxinol wurde die zu sofortiger Immobilisation nötige Konzentration nicht ausgetestet; eine Konzentration von 75 µg/ml jedenfalls hatte keine sofortige immobilisierende Wirkung.

Eine Erklärung für die niedrigere Konzentration von RS-37 367 zur Immobilisation von Hundespermatozoen sahen VICKERY et al. (95) in der Unabhängigkeit der Motilität von Hundesperma von der Fruktolyse; Hunden fehlt das Samenbläschen und damit die im Seminalplasma vorhandene Fruktose.

Infolge seiner Spermizidität bei geringer Dosierung scheinen weitere Untersuchungen zur Tauglichkeit als vaginales Kontrazeptivum gerechtfertigt.

2.3.3.3. Kontrazeptivum mit dem Wirkstoff Natrium-Cellulosetrischwefelsäureester (CTSA)

CTSA ist der deklarierte Wirkstoff des in den 50er Jahren von Dr. Herbrand entwickelten chemischen Kontrazeptivums a-gen 53.

In einem Vaginalovulum von 2,5 Gramm sind 0,1 Gramm des Wirkstoffs enthalten.

Anwendung laut Prospekt (22): A-gen 53 wirkt lokal und auf kurze Zeit kontrazeptiv. Es wird deshalb bei Kontraindikationen der Pille oder bei Pillenunverträglichkeit beziehungsweise bei nur gelegentlichen Kohabitationen angewendet. Zehn Minuten vor dem Verkehr wird ein Ovulum in die Vagina eingeführt. Innerhalb dieser Zeitspanne schmilzt das Zäpfchen durch die Körperwärme und gibt seinen Wirkstoff CTSA frei. Die gelöste Masse überzieht die gesamte Vagina und das Collum uteri mit einer Schicht. Der Schutz hält circa zwei Stunden an. Vor jedem weiteren Verkehr muß erneut ein Ovulum eingeführt werden.

Chemie: Das Natriumsalz des Cellulosetrisulfatesters, eine Polysaccharidverbindung, hat ein Molekulargewicht zwischen 68 und 2000 kdal.

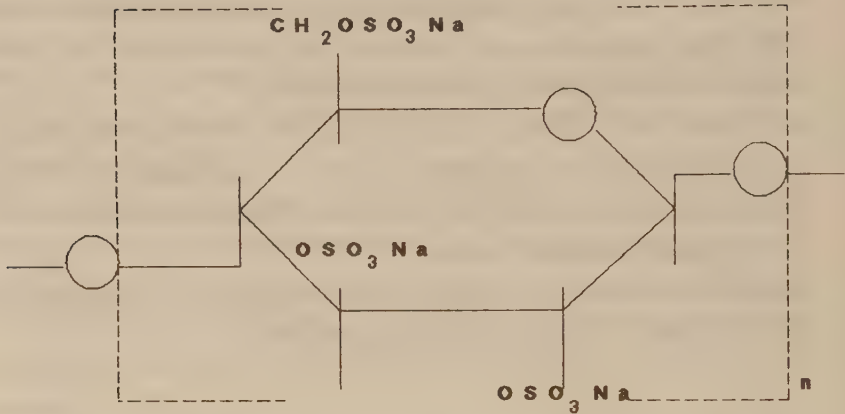


Abbildung 2: Strukturformel des Natrium-Cellulosetrisulfatesters (23)

Wirkweise laut Hersteller Dr. Herbrand KG, Gengenbach (11,41,42):

Der Wirkstoff CTSA greift angeblich an mehreren Stellen zugleich in den Ablauf des Befruchtungsvorgangs ein. Er ist kein oberflächenaktives Spermizid, wie es die meisten intravaginalen Kontrazeptiva enthalten, sondern ein Irreversibler Enzymhemmer. So soll er eine Hemmung der Hyaluronidase in Seminalplasma und Akrosom bewirken. Hyaluronidase ist im Seminalplasma vorhanden und sorgt für die Auflösung und damit die Passierbarkeit des Cervixschleimpfropfes; die Spermatozoenaszension wird dadurch ermöglicht. Auch im Akrosom des Spermatozoons ist Hyaluronidase enthalten,

die dazu nötig ist, beim Vorgang der Befruchtung die hyaluronsäurehaltige Corona radiata anzudauen.

Als zweiter Angriffspunkt für CTSA wird die Hemmung der Fruktolyse genannt. Fruktose und Glucose sind die hauptsächlichen Energiespender für das Spermatozoon. Durch Veränderungen an der Membran soll CTSA die Aufnahmefähigkeit für beide Substanzen verhindern. Das hat in kurzer Zeit den Verlust der Eigenbeweglichkeit und das Absterben der Spermatozoen zur Folge.

Die Testungen, die die Wirksamkeit von CTSA belegen sollten, wurden an Seeigeliern durchgeführt mit folgenden Konzentrationen der Testsubstanz:

1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 6000.

Dabei führten alle Versuche bis zur Verdünnung von 1 : 200 zu "einer vollkommenen oder nahezu vollkommenen Unterdrückung der Besamung und Entwicklung" (11). Bei Ausfall der Besamung wurde eine Verdichtung der Gallertkapsel beobachtet, was zu der Annahme führte, daß CTSA die zur Verquellung und Viskositätsabnahme führenden Enzyme unterband.

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt:

- mit der Substanz des Wirkstoffs
- mit Ovula, die 30 mg Borsäure und 30 mg Zitronensäure enthielten
- mit Ovula, die zu 30 mg Borsäure und 30 mg Zitronensäure zusätzlich 0,5 mg Wirkstoff enthielten
- mit Ovula, die nur 0,5 mg Wirkstoff enthielten

Geprüft wurde die Gewebefreundlichkeit, die Toxizität und die antikonzeptionelle Wirkung.

Die Prüfung der Gewebefreundlichkeit erfolgte an der Bindehaut von Meerschweinchen (Substanz des Wirkstoffs in einer Konzentration von 0,05%-20%), an der vaginalen Schleimhaut (mit den Globuli I-III) und am Peritoneum durch intraperitoneale Injektionen von 5, 10, und 20%igen Lösungen.

Bei allen Testungen ergaben sich weder entzündliche Reaktionen noch Reizungen.

Die Toxizität wurde durch intraperitoneale Injektionen der wässrigen Lösung der Wirksubstanz geprüft.

Die mittlere letale Dosis betrug 150 mg/kg. Bei einer antikonzeptionellen Dosis von 0,2 mg/kg ergibt sich ein Verhältnis zur letalen Dosis von 1 : 750.

Die antikonzeptionelle Wirkung wurde durch Verpaarungsversuche mit Kaninchen überprüft. Getestet wurden nur die Globuli. Es erfolgten zwei Versuche mit den Ovula, die nur Borsäure und Zitronensäure enthielten. Bei beiden Versuchen kam es zu einer Schwangerschaft.

21 Versuche wurden mit Ovula durchgeführt, die 0,5 mg Wirkstoff ausschließlich oder zusätzlich zu Bor- und Zitronensäure enthielten. In keinem Fall kam es zu einer Empfängnis.

Untersuchungen unter dem Mikroskop ergaben folgende Ergebnisse:

Nach Zerschmelzen eines CTSA enthaltenden Suppositoriumstückes auf dem Objektträger und Zugabe von Humanspermalösung zeigten sich nach 100 Sekunden keine lebenden Spermatozoen mehr.

Auch bei Umkehr des Versuches, nämlich bei Zugabe von einem Tropfen zerschmolzenem CTSA enthaltendem Suppositorium zu menschlicher Spermalösung sah man nach 100 Sekunden keine lebenden Spermatozoen mehr. Die Spermatozoenbeweglichkeit war völlig aufgehoben.

Diese Versuche führten auch im Beisein von Cervixschleim zu denselben Ergebnissen.

Für die humanbiologischen Versuche wurde der Wirkstoff in einem "geeigneten Trägerstoff inkorporiert" (11).

Das Suppositorium wurde direkt vor dem Verkehr in die Scheide eingeführt. Untersuchungen des Cervixschleims und des Vaginalsekretes jeweils vier Minuten, zehn Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und zwei Stunden post coitum ergaben:

vier Minuten nach Ejakulation: keine Spermatozoen im Cervikalschleim

nur tote Spermatozoen im Vaginalsekret

zwei Stunden post coitum: keine Spermatozoen im Cervikalschleim

nur tote Spermatozoen in der Scheide

Im Kontrollversuch befanden sich in der Cervix zwei Stunden post coitum massenhaft lebende Spermatozoen.

Klinische Prüfungen des Vaginalsuppositoriums a-gen 53 wurden u.a. von Nicolas FLORENCE (24, 31) in einer Fünfjahresstudie und von GODTS (36) durchgeführt. Bei FLORENCE haben im Verlauf von fünf Jahren insgesamt 103 Frauen a-gen 53 angewendet, möglichst mit einer Mindestanwendungsdauer von fünf aufeinanderfolgenden Monaten. Letztlich resultierten 2255 Cyclen bei 103 Frauen mit einer Anwendungsdauer von zwei bis 61 Monaten. Bei zwei Anwendungen kam es zu einer unerwünschten Schwangerschaft. Nach FLORENCE beträgt der Pearl-Index demnach 1,1 auf 100 Frauenjahre.

GODTS Untersuchung dauerte circa drei Jahre. 56 Frauen verwendeten a-gen 53 mindestens sechs Monate lang. Bei einer Anwendungsdauer von sechs bis 32 Monaten ergaben sich 1344 Cyclen. Insgesamt kam es zweimal zu unerwünschter Schwangerschaft. Bei GODTS ergibt sich also für a-gen 53 ein Pearl-Index von 1,7 auf 100 Frauenjahre.

Auch bei den klinischen Prüfungen von DÖRING (26), HILDEBRANDT (43) und ZIEGLER (102) ergaben sich ähnlich zufriedenstellende Ergebnisse.

Diesen Untersuchungen zufolge bietet das Suppositorium a-gen 53 einen hohen Sicherheitsgrad.

In jüngster Zeit wurde allerdings in Frage gestellt, ob die Wirksamkeit von a-gen 53 als Antikonzipiens auf dem deklarierten Wirkstoff CTSA beruht. Parallel zur vorliegenden Arbeit liefen Untersuchungen, die zum einen das Ovulum als Testsubstanz, zum anderen den reinen Wirkstoff CTSA als Testsubstanz verwendeten (84).

2.3.4. Operative Sterilisation als irreversible Methode

Sie wird von Frauen bevorzugt, deren Familienplanung abgeschlossen ist oder für die aus gesundheitlichen Gründen eine Schwangerschaft unzumutbar ist. Die Techniken wie die Erfolgsaussichten sind unterschiedlich.

Die einfache Ligatur der Tube mit nicht resorbierbarem Material nach Madlener hat eine hohe Versagerquote.

Bei der Tubensterilisation nach Pomeroy wird der mittlere Tubenabschnitt jeder Tube in einer Länge von zwei Zentimetern abgebunden und reseziert. Sowohl vaginale als auch abdominale Durchführung ist möglich (35).

Bei der Methode nach Irving wird jede Tube im isthmischen Teil durchtrennt und beide Stümpfe separat versenkt. Diese Methode ist sehr zuverlässig. Die Voraussetzungen für eine spätere Tubenanastomose sind relativ günstig.

Die laparoskopische Sterilisation beruht auf der Elektrokoagulation beider Tuben im mittleren Drittel unter laparoskopischer Sicht. Der Vorteil der Methode liegt in der geringen operativen Belastung und dem kürzeren Krankenhausaufenthalt (zwei bis drei Tage). Das Verfahren ist sehr sicher, die Versagerquote liegt bei 0,9% (88) .

2.4. Biologische Voraussetzungen einer Konzeption von Seiten des Mannes

2.4.1. Aufbau des Spermatozoons

Die Produktion funktionstüchtiger Spermatozoen ist von einer ungestörten Hodenfunktion abhängig.

Das Spermatozoon gliedert sich in Kopf, Hals und Schwanz. Wichtigster Bestandteil des Kopfes ist der Zellkern, der das genetische Material enthält. Über seinen vorderen Pol stülpt sich eine kappenartige Umhüllung, das Akrosom. Es wird von einer inneren akrosomalen Membran und einer äußeren akrosomalen Membran gebildet. Beide Membranen gehen im Bereich des Äquatorialssegments ineinander über und schließen so einen Hohlraum ab. Dieser enthält die Penetrationsenzyme, die zur Perforation der Eihülle notwendig sind: Hyaluronidase, "corona-penetrating enzyme", Akrosin und dessen Inhibitor.

Über das Akrosom und das gesamte Spermatozoon legt sich die Plasmamembran. Der Hals enthält die Zentriolen.

Der Schwanz besteht aus Mittelstück, Hauptstück und Endstück und bedingt die Beweglichkeit des Spermatozoons. Im Mittelstück sind die Mitochondrien lokalisiert, in denen die Stoffwechselvorgänge ablaufen, die u.a. zur Bereitstellung der Energie für die Motilität des Spermatozoons dienen.

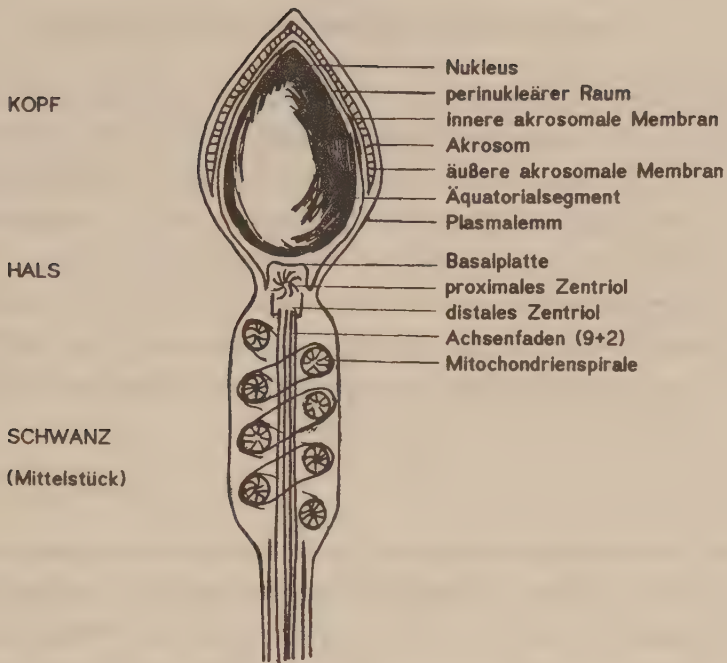


Abb. 3: Schematischer Aufbau des menschlichen Spermatozoons

2.4.2. Wichtigste Fertilitätsparameter des Spermatozoons

2.4.2.1. Spermatozoenmorphologie

Fertile Männer haben durchschnittlich 70–90% normal gestaltete Spermatozoen. Sind mehr als 50% der Spermatozoen bei normaler Spermatozoendichte pathologisch, spricht man von einer Teratozoospermie. In der Regel sind zusätzlich Dichte und Motilität vermindert, so daß eine Oligoasthenoteratozoospermie resultiert.

Das normal gestaltete Spermatozoon ist circa 60 µm lang. Sein Kopf ist in der Aufsicht oval, in der Seitensicht birnenförmig. Es hat ein schlankes Mittelstück und einen dünn auslaufenden Schwanzfaden. Pathologische Veränderungen können alle drei Regionen betreffen. Am häufigsten sind jedoch die Mißbildungen des Kopfes.

2.4.3. Voraussetzungen zur Befruchtungsfähigkeit des Spermatozoons

Die Spermatozoen müssen nach ihrer Deposition im Vaginaltrakt bis zur Ampulle der Tube aufsteigen. Während ihrer Aszension erfahren sie im weiblichen Genitaltrakt strukturelle Änderungen, die sie erst zur Befruchtung des Eis befähigen (13).

Die Veränderungen, die zur Befruchtungsfähigkeit des Spermatozoons führen, betreffen einmal den Bereich des Akrosoms und ermöglichen erst den Ablauf der Akrosomreaktion, der zur Freisetzung des Akrosins führt. Zum anderen resultiert eine Modifizierung im Bewegungsmuster des Schwanzes. Es kommt zu einer hyperaktivierten Bewegung, die die Akrosomreaktion begleitet, aber unabhängig von ihr ist.

2.4.3.1. Kapazitation

Der Begriff "Kapazitation" wurde 1952 von AUSTIN (2) in die Literatur eingeführt und beinhaltet sämtliche Wandlungen, denen sich ein Spermatozoon unterziehen muß, bevor es zur Penetration des Eis fähig ist. Nach dieser Auffassung fallen unter den Begriff "Kapazitation" alle Vorgänge der Aktivierung, die sowohl die Akrosomreaktion als auch die Hyperaktivierung zur Folge haben.

REYES et al. (1980) gliedern den Prozeß der Kapazitation in verschiedene aufeinanderfolgende Schritte:

- Aktivierung: Änderung des Bewegungsmusters
- Änderung der Membraneigenschaften, die das Verschmelzen von akrosomaler und Plasmamembran erleichtern soll
- Akrosomreaktion
- Vorbereitung der Oberflächenstruktur des Spermatozoons für die Fusion mit der Oozyte

Die genauen Veränderungen, die der Vorgang der Kapazitation am Spermatozoon bewirkt, sind noch weitgehend ungeklärt.

Die Kapazitation beginnt mit der Änderung des Bewegungsmusters und einem Anstieg der metabolischen Aktivität des Spermatozoons, die sich u.a. in einer wachsenden glykolytischen Aktivität und in einer Änderung der Glucoseutilisation zeigt (73).

Außerdem nimmt man heute an, daß während der Kapazitation biochemische Veränderungen am akrosomalen Membrankomplex stattfinden. Bisher bekannt ist die Befreiung des Spermatozoons von Bestandteilen des Seminalplasmas, die dem gesamten Spermatozoon vor allem im Bereich des Kopfes anhaften und die Fertilisation verhindern.

Inkubiert man bereits kapazitierte Spermatozoen wieder in Seminalplasma, werden diese dadurch dekapazitiert und befruchtungsunfähig. Bis jetzt sind zwei der Komponenten des Seminalplasmas, die eine Dekapazitation bewirken, bekannt: der Dekapazitationsfaktor (6, 46) und der Proteinasehemmer Akrostatin (46).

In vivo werden die Spermatozoen auf ihrem Weg durch den weiblichen Genitaltrakt von den verschiedenen Sekreten in Uterus und Tube zur Kapazitation angeregt.

Die Kapazitationsfähigkeit von Uterus und Tube kann hormonell kontrolliert werden: Ein Mindestmaß an Östrogenen ist Voraussetzung für die Fähigkeit des weiblichen Genitaltraktes zur Ermöglichung der Spermatozoonkapazitation (46).

Abwesenheit von Östrogenen, Progesteroneinfluß, Pseudoschwangerschaft und beiderseitige Ovariectomie reduzieren die Kapazitation erheblich, während Östrogeneinfluß den Kapazitationsvorgang stimuliert (34, 46).

Dabei ist die Wirkungsweise der Hormone wahrscheinlich in der Beeinflussung des weiblichen Genitaltraktes und nicht in einer direkten Wirkung auf die Spermatozoen zu sehen.

In vitro kann man die Kapazitation durch Zugabe von makromolekularen Substanzen wie Albumin oder Dextran oder durch Zugabe von Follikelflüssigkeit hervorrufen.

Die Kapazitationsdauer ist individuell unterschiedlich. Nach PERREAULT und ROGERS (1982) weist jeder Spender ein eigenes Kapazitationsmuster auf. Das Kapazitationsmaximum lag in ihren Untersuchungen bei frühestens zwei Stunden, gewöhnlich jedoch bei sechs Stunden nach Ejakulation. Bei einigen Probanden zeigte sich das Maximum sogar zu noch späteren Zeitpunkten.

2.4.3.2. Hyperaktivtion

Als Hyperaktivtion der Spermatozoen bezeichnet man einen besonderen Zustand der Bewegung, den kapazitierte Spermatozoen kurz vor der Befruchtung aufweisen.

Es sind drei Besonderheiten in der Motilität festzustellen:

- Die Schwanzbewegungen werden ausholender und die Amplitude der Schwanzwelle steigt. Dieses Bewegungsmuster erinnert an Peitschenschläge und wird auch Wip-lash-Bewegung genannt (51).
- Gleichzeitig kommt es zu einer ausgeprägten Seitverschiebung des Kopfes, dem "lateral head displacement" (91).
- Eine Veränderung der Schlagsymmetrie führt zu einer Asymmetrie im Bewegungsbild und zu einer Bewegung auf kreisförmigen Bahnen (21).

Die Hyperaktivtion dürfte zwar keine unabdingbare Voraussetzung für die Befruchtung sein, aber die veränderte und verstärkte Beweglichkeit kann einmal die Häufigkeit des Zusammentreffens von Spermatozoon und Ei steigern (51) und zum anderen die Penetration durch die Corona radiata und die Zona pellucida begünstigen (7).

2.4.3.3. Akrosomreaktion

Voraussetzung für den Ablauf der Akrosomreaktion ist die Kapazitation. Diese beinhaltet nach AUSTIN und BISHOP (3) eine Veränderung des Akrosoms während des Durchtritts durch den weiblichen Genitaltrakt, bei der es zu einer Ablösung des Akrosoms vor der Penetration des Eis kommt.

Bei elektronenmikroskopischen Beobachtungen der Akrosomreaktion zeigte sich, daß zuerst eine Bläschenbildung der Membran oder mehrfache Verschmelzungen zwischen der Plasma- und der darunterliegenden äußeren akrosomalen Membran stattfinden (4, 5,68). Die Vesikulation beginnt an der posterioren äquatorialen Membran und setzt sich in Richtung Akrosomenspitze fort. Die periakrosomale Region ist umgeben von einer Hülle von fusionierten Membranen. Die fusionierten Membranen lösen sich vom Kopf des Spermatozoons und der Inhalt des Akrosoms kann entweichen (69). Neben

typischen lysosomalen Hydrolasen enthält das Akrosom die für die Penetration durch die dreischichtige Hülle des Eis wichtigen Enzyme Akrosin, "corona-penetrating enzyme" und Hyaluronidase (80). Die innere akrosomale Membran wird zur nach außen abgrenzenden Membran.

Nach neuesten Erkenntnissen findet der Ablauf der Akrosomreaktion bei Säugetierspermatozoen an der Oberfläche der Zona pellucida statt (20, 100).

CROZET (1984) führte u.a. in-vivo-Untersuchungen der Penetration bei Schaf-Oozyten durch. Hinweise für das Stattfinden der Akrosomreaktion penetrierender Spermatozoen an der Oberfläche der Zona pellucida ergaben sich aus dem Auffinden von Resten der fusionierten Plasma- und der äußeren akrosomalen Membran an der Zona-Oberfläche jedes befruchteten Eis.

Auch YANAGIMACHI und PHILLIPS (1984) fanden bei ihren in-vivo-Untersuchungen an Hamsterspermatozoen kurz vor der Befruchtung Reste akrosomaler Kappen an der Zona pellucida. Sie nannten diese Überreste "acrosomal ghosts".

Lichtmikroskopische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten ergaben:

- motile Spermatozoen, die aus der Ampulle aufgenommen und untersucht wurden, waren zwar hyperaktiviert, hatten aber größtenteils (71%) intakte akrosomale Membranstrukturen beziehungsweise ein modifiziertes, geschwollenes Akrosom (29%).
- fast alle Spermatozoen, die aus dem Cumulus oophorus entnommen wurden, wiesen eine Modifizierung des Akrosoms auf (bis auf eine Ausnahme).

Spermatozoen, die in oder auf der Zona pellucida zu sehen waren, wurden elektronenmikroskopisch untersucht:

- es zeigte sich, daß noch nicht in die Zona pellucida eingedrungene Spermatozoen am Kopf mit der Zona durch die "acrosomal ghosts" verbunden waren. Während der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida wurden die Überreste immer weiter zurückgelassen.

Die Auslösung der Akrosomreaktion erfolgt bei Erreichen eines bestimmten Calciumniveaus in einem physiologischen Milieu (7,32,89) und ist unabhängig von Einflüssen der Oozyte. Ebenfalls erforderlich für den Ablauf der Akrosomreaktion ist die Anwesenheit von Glucose. Pyruvat und Lactat wirken zusätzlich reaktionsfördernd (28).

In jeder Säugetierspermatozoenpopulation läuft die Akrosomreaktion sowohl in vitro wie in vivo asynchron ab, d.h. kurz nach Einbringung in ein Kapazitationsmedium sind nur wenige der Spermatozoen reagiert, jedoch steigt die Zahl der reagierten Spermatozoen mit der Zeit an. Üblicherweise sind nach einer Spanne von zwei bis vier Stunden oder mehr circa 50% der motilen Spermatozoen reagiert (7).

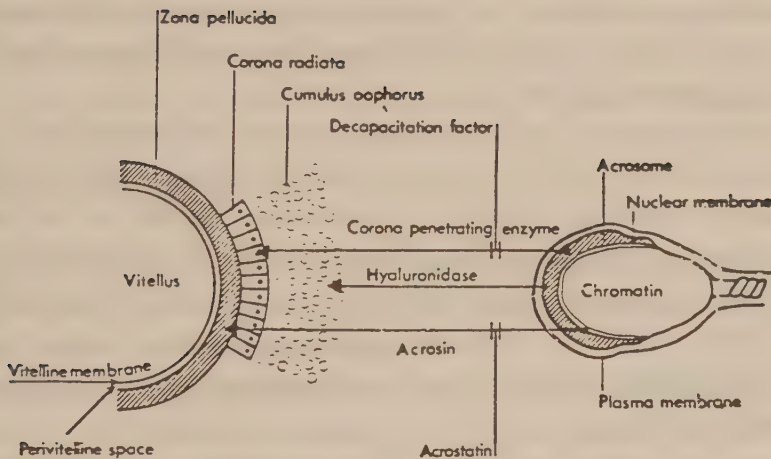


Abbildung 4: Schematische Zeichnung, die das Akrosom mit den Penetrationsenzymen und die korrespondierenden Membranen der Oozyte zeigen (nach SCHILL, 1980)

Von der "echten" Akrosomreaktion, die durch die Fusion der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran sowie durch die Vesikelbildung gekennzeichnet ist, müssen auf anderer Grundlage entstehende, strukturelle Veränderungen abgegrenzt werden, die ebenfalls mit einem Akrosomverlust einhergehen.

Diese sogenannte "falsche" Reaktion ist ein Ergebnis unspezifischer Degeneration und tritt bei Einwirkung von Schadstoffen auf die Spermatozoen auf. Sowohl die Plasmamembran als auch die akrosomalen Membranen zeigen Einrisse und lösen sich einzeln und in zufälliger Weise. Jedoch tritt diese Art der akrosomalen Degeneration recht selten auf (weniger als 1% der degenerierten Spermatozoen zeigen diese Veränderung) (5).

2.4.4. Die Befruchtung

Die Vereinigung der Gameten findet in der Regel in der Ampulle des Eileiters statt und muß in den ersten Stunden nach der Ovulation erfolgen, da das unbefruchtete Ei nur kurz lebensfähig ist (88).

Wenn die Spermatozoen den Cumulus oophorus und die Corona radiata durchdringen, beginnen die meisten ihre Akrosomreaktion (100). Nur kapazitierte und akrosomreagierte Spermatozoen vermögen an die Zona pellucida anzuheften (44). Hat ein Spermatozoon die Zona pellucida erreicht, fixiert es sich daran durch die Reste seiner akrosomalen Strukturen ("acrosomal ghosts"). Dadurch wird der Spermatozoonkopf, der sich in Richtung der "acrosomal ghosts" lagert, wahrscheinlich an der Zona fest- und in der richtigen Lage gehalten, die für die Durchdringung der Zona pellucida am günstigsten ist (100).

Hat das erste Spermatozoon die Zona pellucida durchdrungen und ist in den Perivitellinraum gelangt, kommt es zu einer Zonareaktion, die das Eindringen weiterer Spermatozoen verhindert. Die Zonareaktion beruht auf physikochemischen Veränderungen und wird vermutlich durch unter der Plasmamembran der sekundären Oozyte liegende kortikale Granula ausgelöst, die lysosomale Enzyme freisetzen (61).

Die Zona pellucida fungiert sowohl als Barriere gegen Polyspermie als auch als unüberwindliches Hindernis für artfremde Spermatozoen (46).

Bei Kontakt des Spermatozoons mit der Vitellinmembran der Oozyte erfolgt die Vollendung der zweiten meiotischen Reifeteilung der Oozyte (46). Hat sich das Spermatozoon an die Vitellinmembran angelegt, verschmelzen die Zellmembranen beider Gameten. Die gesamte Samenzelle dringt in das Zytoplasma der Oozyte ein.

Der Schwanzteil des eingedrungenen Spermatozoons degeneriert, während der Kopf zum männlichen Vorkern anschwillt. Der Zellkern der Eizelle wird zum weiblichen Vorkern. Beide Vorkerne verschmelzen miteinander und bilden die Zygote.

2.5. Möglichkeiten der Konzeptionsverhütung durch den Mann

Als Angriffspunkte für die Antikonception beim Mann wären denkbar:

- Hemmung der Spermatogenese und der Spermatozoenreifung
- Beeinflussung der Ejakulatsverflüssigung
- Verhinderung der Spermatozoenkapazitation
- Erschwerung der Spermatozoenpenetration
- Unterbrechung der ableitenden Samenwege und damit des Spermatozoentransports

2.6. Kontrazeptive Methoden

Kontrazeptive Mittel für den Mann müssen sicher, aber reversibel sein, dürfen keine genetischen Veränderungen hervorrufen und sollten keinen Einfluß auf Libido, Potenz und sekundäre Geschlechtsmerkmale zeigen.

Eine empfängnisverhütende Methode ohne Anwendung von Mitteln ist der Coitus Interruptus, bei dem der Samenerguß außerhalb der Vagina erfolgt. Nachteil ist die schwere Einschätzbarkeit des Beginns des Samenausstoßes und die daraus resultierende hohe Versagerquote.

Die Anwendung des Kondoms als mechanische Methode der Empfängnisverhütung ist weit verbreitet und ist im Steigen begriffen. Die Vorteile liegen in der relativen Zuverlässigkeit, die durch den Zusatz von Spermiziden noch gesteigert werden kann und in seiner zusätzlichen Bedeutung als Schutz vor venerischen Infektionen. Seine Verwendung ist absolut unschädlich. Die Versagerquote ist gering und beruht vorwiegend auf Anwendungsfehlern.

Die anwendbaren reversiblen Methoden zur Kontrazeption von Seiten des Mannes sind damit erschöpft. Die Möglichkeit, die männliche Fertilität durch geeignete Wirkstoffe temporär einzuschränken, befindet sich noch im Versuchsstadium.

2.6.1. Hemmung der Spermatogenese und der Spermatozoenreifung

Die Hemmung der Spermatogenese kann durch antispermatogene Substanzen oder durch Hormone beziehungsweise deren Inhibitoren erfolgen. Nachweis Kriterium für die kontrazeptive Sicherheit ist das Erreichen der Azoospermie.

Zu den antispermatogenen Substanzen zählen Schwermetalle, Zytostatika und einige Chemotherapeutika. Schwermetalle und Zytostatika bewirken meist eine irreversible Azoospermie und sind wegen ihrer Toxizität nicht als Kontrazeptiva geeignet. Unter den Chemotherapeutika sind seit langem Nitrofurane und Thiophene als Substanzen bekannt, die bei Tieren ohne Beeinflussung der Gonadotropinsekretion und der Leydig-Zellen-Funktion die Spermiogenese hemmen (75). Für die Anwendung bei Menschen ist die Wirksamkeit der Nitrofurane jedoch zu gering und die Toxizität bei wirksamen Dosen von Thiophenen zu hoch.

Ein Derivat von Bis-(dichloracetyl)-diaminen wurde bei männlichen Versuchspersonen erprobt. Nach einer Behandlung mit 2 x 0,6 g täglich oral wurde am 80. Behandlungstag eine völlige Unterdrückung der Spermiogenese erreicht. Die Azoospermie dauerte ohne Behandlung noch 25 Tage an und war voll reversibel (75). Schwere Nebenerscheinungen in Form von Kreislaufreaktionen, die im Zusammenhang mit Alkoholfuhr auftraten, verhindern seine Verwendung als Kontrazeptivum.

Ein weiterer antispermato gener Wirkstoff ist Gossypol. Diese Substanz wurde in China erprobt und bewirkt eine reversible Infertilität infolge Nekrozoospermie oder Oligozoospermie. In den notwendigen Dosen soll eine toxische Wirkung nicht zu erwarten sein. Da nur selten Azoospermie eintritt, ist seine Verwendung als Kontrazeptivum fraglich.

Hormone können die männliche Fruchtbarkeit durch eine Unterdrückung der Gonadotropinsekretion des Hypophysenvorderlappens und die daraus resultierende Funktionsstörung der Leydig'schen Zwischenzellen hemmen. Auch eine direkte testikuläre Wirkung durch die Blockade von LH- und Testosteron-Rezeptoren ist möglich. Infrage kommen Östrogene, Gestagene, Androgene sowie Kombinationen dieser Hormone, außerdem Antiandrogene und Analoge des Gonadotropin-Releasing-Hormons.

Die weiblichen Sexualhormone verbieten sich schon wegen gravierender Nebenwirkungen für den kontrazeptiven Einsatz.

Bei der alleinigen Anwendung von Androgenen beziehungsweise ihrer Kombination mit weiblichen Sexualhormonen ist ein Eintreten der Azoospermie nicht gewährleistet; irreversible Schädigungen sind möglich. Orale Verabreichung in Dosen, die die Spermatogenese hemmen, führt zu einer toxischen Wirkung auf die Leber (65).

Unter den Antiandrogenen ist Cyproteronacetat am bekanntesten. Das Wirkprinzip liegt in der Hemmung der Androgenrezeptoren, so daß eine Suppression der Spermatogenese resultiert. Kontrazeptiv wirkende Dosierungen sind jedoch mit ungünstigen Nebenerscheinungen wie Potenzstörungen und Adymien verbunden.

Ob die Möglichkeit, durch Analoge des Gonadotropin-Releasing-Hormons die testikulären LH- und Prolaktin-Rezeptoren zu blockieren und damit eine Hemmung der Spermatogenese herbeizuführen, für kontrazeptive Zwecke genutzt werden kann, ist zweifelhaft.

2.6.2. Hemmung der Spermatozoenkapazitation beziehungsweise der Penetrationsenzyme

Die bekannten Penetrationsenzyme sind Hyaluronidase, "corona-penetrating-enzyme", Akrosin und dessen Inhibitor.

Akrosin wurde bisher am besten untersucht. Es weist ein Molekulargewicht zwischen 34 000 und 70 000 Dalton auf, seine Aktivierung ist pH-abhängig (37). Seine Rolle im Befruchtungsprozeß ist vielfältig. Durch seine proteolytische Aktivität erleichtert es die Spermatozoenpassage durch den Cervixschleim und stimuliert die Spermatozoenmotilität und die Wanderung im weiblichen Genitaltrakt durch Freisetzung von Kinin (85). Schließlich ermöglicht es die Penetration der Zona pellucida durch eine limitierte Proteolyse ihrer Glykoproteine (37).

Der natürliche Inhibitor des Akrosins wird in den Samenbläschen synthetisiert und ist in den Vesikulardrüsen und im Sperma der Säugetiere vorhanden (34). Er bindet reversibel an das Spermatozoon und kann während der Verweildauer im weiblichen Genitaltrakt losgelöst werden (101).

Untersuchungen von Akrosin-Trypsin-Inhibitoren aus Eberspermplasma mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigten eine Lokalisation der Inhibitoren im Bereich der Akrosomenkappe ejakulierter Spermatozoen, kein Vorhandensein bei testikulären und epididymalen oder uterinen Spermatozoen (86).

Neben den natürlichen Inhibitoren sind synthetische Akrosininhibitoren bekannt. Sie haben meist ein niedrigeres Molekulargewicht und binden sich entweder irreversibel an die Spermatozoen oder lösen sich nur sehr langsam aus ihrer Bindung (101).

Aufgrund der Lokalisation des Akrosins im Akrosom (78,81,96) besteht die grundsätzliche Voraussetzung für eine intraakrosomale Hemmung dieses Enzyms in der Durchgängigkeit der akrosomalen Membranen für die Inhibitoren. Im Genitaltrakt physiologisch vorkommende Akrosinhemmer wie Leukostatin und Akrostatin sind nicht fähig, intakte akrosomale Membranen zu durchdringen (37,80). Mehrere meist synthetische Substanzen wurden auf ihre diesbezügliche Eignung untersucht (12,48, 64). Nur wenige waren bisher in der Lage, Akrosin intraakrosomal zu hemmen (85). Diese erwiesen sich jedoch entweder als zu toxisch wie NPGB (4-nitrophenyl-4-guanidinobenzoate) oder die für eine Hemmwirkung erforderliche Konzentration konnte aufgrund der Verdünnung mit dem Ejakulat und der vaginalen Sekretion nicht erreicht werden (Aprotinin)(85).

2.6.3. Unterbrechung der ableitenden Samenwege und damit des Spermatozoentransports

Das bisher sicherste Verfahren zur Kontrazeption des Mannes ist die Vasektomie. Dieses Verfahren besteht in der Resektion eines circa ein Zentimeter langen scrotalen Anteils des Ductus deferens auf beiden Seiten und wird in Lokalanästhesie ambulant durchgeführt. Um den Eintritt der Azoospermie zu beschleunigen, werden die ableitenden Samenwege mit physiologischer Kochsalzlösung und spermiziden Lösungen gespült. Zur Erfolgskontrolle werden postoperativ Spermiogramme erstellt. Mindestens zweimal sollte Azoospermie nachgewiesen werden können.

Der Vorteil der Vasektomie liegt in der Zuverlässigkeit (1% Versager) und dem geringen Operationsrisiko im Vergleich zur Tubensterilisation (79).

2.7. Sicherheit der beschriebenen kontrazeptiven Methoden

Die Wirksamkeit einer kontrazeptiven Methode wird mit dem Pearl-Index ausgedrückt. Der Pearl-Index errechnet sich aus der Zahl der ungewollten Schwangerschaften pro 100 Frauenjahre (= 1200 Anwendungsmonate). In die Versagerquote gehen nicht nur Schwangerschaften aufgrund mangelnder Wirksamkeit der Methode, sondern auch Schwangerschaften aufgrund von Anwendungsfehlern ein.

Der Pearl-Index der einzelnen Methoden sollte auch in Bezug auf die Zahl entstehender Schwangerschaften pro 100 Frauenjahre ohne jegliche Verhütungsmaßnahmen gesehen werden, die sich auf 60-80 Schwangerschaften beläuft.

Ein objektiver Vergleich der Zuverlässigkeit verschiedener empfängnisverhütender Methoden wird durch die Betrachtung des Pearl-Index möglich.

Kontrazeptive Methode	Pearl-Index (ungewollte Schwangerschaften auf 100 Frauenjahre)	Literatur
keine Verhütungsmaßnahmen	60-80	Schmidt-Matthiessen
periodische Enthaltensamkeit	14-35	"
Temperaturmethode	0,5-3	"
Ovulationshemmer	0,03-0,1	"
Minipille	0,4-4,3	"
Postkoitalpille	Versagerquote: 0,1-2,6% der PI kommt nicht zur Anwendung	"
Intrauterinpessar	0,8-6	"
Scheidendiaphragma (mit und ohne Spermizide)	2,0-25	"
Scheidendiaphragma mit spermizider Creme	4	Döring (27)
Portiokappe	7,6	Tietze et al. (94)
Spermizide Präparate	5-42	Schmidt-Matthiessen
Patentex oval	0,8	Brehm et al. (10)
	5	Döring (27)
Today-Tampon	10,4	Jeker et al. (45)
Benzaltex-Tampon	15	"
Coitus interruptus	10-38	Schmidt-Matthiessen
Coitus condomatus	6-29	"
Operative Sterilisation der Frau	Versagerquote je nach Methode: 0,05-5%	"
Vasektomie	Versagerquote <1%	"

Tabelle 1: Vergleich der Zuverlässigkeit verschiedener kontrazeptiver Methoden anhand des Pearl-Index

3. EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Ejakulate

Für die Untersuchungen wurde durch Masturbation gewonnenes, frisch ejakuliertes Sperma von andrologischen Patienten und Spendern verwendet. Die durchschnittliche sexuelle Karenz betrug vier bis fünf Tage. Voraussetzung für die Tauglichkeit des Spermas war die Norm folgender Parameter im Spermogramm:

- Spermatozoendichte über 40 Millionen/ml
- Gesamtmotilität über 50%
- morphologisch intakte Spermatozoen über 60% (lichtmikroskopisch beurteilt)

Die Spermogramme wurden im andrologischen Routinelabor durch medizinisch-technische Assistentinnen nach den Kriterien von SCHIRREN (1982) erstellt.

Nur in einigen Fällen war die Fertilität des Spenders nachgewiesen.

3.1.2. Lösungen

3.1.2.1. Zur Immunfluoreszenz verwendete Lösungen

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden gewaschene Spermatozoen eingesetzt, da für die Versuche eine Befreiung vom Seminalplasma notwendig war.

Als Waschpuffer wurde ein PBS-Puffer benutzt:

NaCl	8,00 g
KH_2PO_4	0,20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44 g
Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,4	

Zur Fixierung diente 100%iges Methanol.

Die Vorinkubation erfolgte in PBS + 0,5% BSA (bovines Serumalbumin, Fa. Sigma München).

- Verwendete Antikörper: - α -Akrosin-IgG vom Schaf in einer Verdünnung von 1 : 1000
(Institut für Klinische Chemie und Biochemie - Prof. Fritz)
- Anti-Schaf-IgG/FITC in einer Verdünnung von 1 : 16
(Fa. Miles, USA)
- OAM-Antiserum von der Maus in einer Verdünnung von
1 : 500
(Reproduktionsbiologische Arbeitsgruppe Frau Dr. Töpfer)
- Anti-Maus-IgG/FITC in einer Verdünnung von 1 : 16
(Fa. Miles, USA)

3.1.2.2. Bei Motilitätsbeurteilung und Triple-Stain-Technik verwendete Lösungen

Als Waschpuffer wurde eine TMPA-Lösung (4) mit zusätzlich bovinem Serumalbumin

(BSA) benutzt:	NaCl	8,000 g
	KCl	0,200 g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,260 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,212 g
	NaHCO ₃	3.000 g
	Na-Pyruvat	0,036 g
	Glucose	0,900 g
	zusätzlich BSA	3,000 g
	Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,4-7,8	

Als Kapazitationsmedium diente ebenfalls der TMPA-Puffer, hier mit einem Zusatz von humanem Serumalbumin (HSA, Fa. Behringer):

TMPA-Medium + 35 mg/ml HSA ; pH 7,4-7,8

Um den TMPA-Puffer auf den gewünschten pH-Bereich einzustellen, war eine Begasung mit 5% CO₂ erforderlich. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C durchgeführt, da die Kapazitation u.a. temperaturabhängig ist (52). Weil die pH-Einstellung mehrere Stunden in Anspruch nahm, wurde der Puffer vorher steril filtriert, um einem Bakterienwachstum vorzubeugen und vor dem Versuch über Nacht inkubiert. BSA bzw. HSA wurde erst direkt vor dem Versuch zu den Medien gegeben.

Die Triple-Stain-Technik ist eine Drei-Farben-Technik. Die verwendeten Farbstoffe sind der Supravital-Farbstoff Trypanblau, Bismarck-Braun und Bengal-Rosa.

Trypanblau erlaubt die Unterscheidung von toten und lebenden Spermatozoen. Der Farbstoff ist in Pulverform erhältlich und muß in TMPA+HSA-Medium aufgeschwemmt werden. Er wird als 2%ige Lösung verwendet.

Zur Fixierung der Färbung dient Glutaraldehyd: 3%iges Glutaraldehyd in TMPA-BSA-Medium

Die weitere Färbung mit Bismarck-Braun und Bengal-Rosa führt zu einer Differenzierung der akrosomalen Region.

Bismarck-Braun (Fa. Sigma München): 0,8%ig in deionisiertem Wasser (pH 1,8)

Bengal-Rosa (Fa. Sigma München) : 0,8%ig in 0,1 mM Tris-Puffer (pH 5,3)

Bei beiden Färbungen ist eine exakte Einstellung des pH's für das Gelingen notwendig.

3.1.3. CTSA

Die zu testende Substanz Natrium-Cellulosetrischwefelsäureester erhielten wir in Pulverform von der EGA-Chemie (Steinheim).

Bei den Versuchen zur Akrosinfreisetzung und zur Membranbeurteilung, die mit Hilfe der Immunfluoreszenz erfolgten, betrug die Konzentration der Testsubstanz 1%.

Bei den Untersuchungen zur Motilität und zur Akrosomreaktion wurden Konzentrationen von 0,0001%, 0,5%, 1,7% und 5% getestet. Die Verdünnung der Testsubstanz auf die jeweilige Konzentration erfolgte mit dem Kapazitationsmedium TMPA+HSA.

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchsanordnung zur Beurteilung der Akrosinfreisetzung und der äußeren akrosomalen Membran mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

3.2.1.1. Prinzip der Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf einer Absorption des Lichts durch bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorochrome.

Die Energie der entstehenden Photonen wird auf Elektronen übertragen, die dadurch ein höheres Energieniveau erreichen. Kehrt das Elektron auf das niedrigste Energieniveau der Schwingungsebene zurück, gibt es Wärme frei und wird nach kurzer Zeit zum Photon, jedoch auf niedrigerem Energieniveau als das ursprüngliche Photon.

Die Wellenlängen, die die Moleküle zum Fluoreszieren bringen, bezeichnet man als Exzitationsspektrum, die Wellenlängen des ausgesendeten fluoreszierenden Lichts als Emissionsspektrum (97).

Fluoreszierende Stoffe, gekoppelt an Antikörper, wurden erstmals von COONS (15,16 17, 18) benutzt, um Antigene aufzufinden. Er koppelte Antikörper an β -Anthracene oder Fluorescein Isocyanate und konnte zeigen, daß durch die Fluoreszenz die zugehörigen Antigene exakt lokalisiert werden konnten. Einige Zeit später wurde das Fluorescein Isothiocyanat (FITC) erprobt, das sich als stabiler erwies (74) und heute noch gebräuchlich ist.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die Proben mit einem Antikörper versetzt. Nach abgelaufener Bindung des Antikörpers an das Antigen wird das überschüssige Material ausgewaschen. Ein fluorochrom-gebundener Anti-Immunglobulin-Antikörper wird zugegeben und läßt durch Bindung an den ersten Antikörper diesen und somit die Lokalisation des Antigens erkennen.

Der Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz gegenüber der direkten Immunfluoreszenz, bei der der fluorochrom-gebundene Antikörper direkt auf die Probe aufgetragen wird, besteht in einer dichteren Fluoreszenz, da viele zweite Antikörper an einen ersten Antikörper binden können.

Der Nachteil der indirekten Immunfluoreszenz besteht in der größeren Möglichkeit von Kreuzreaktionen. Um unspezifische Reaktionen erkennen zu können, muß deshalb bei jedem Versuch eine Kontrolle mitlaufen.

3.2.1.2. Versuchsziel

Die vorliegenden Versuche zur Immunfluoreszenz dienen zur Beobachtung der Akrosinfreisetzung und zur Beurteilung der Beschaffenheit der äußeren akrosomalen Membran und sollen eine eventuelle Veränderung dieser beiden Parameter bei Zugabe von 1%igem CTSA aufzeigen.

Zum einen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Freisetzung von Akrosin aus dem Akrosom untersucht. Als erster Antikörper wurde das α -Akrosin-IgG vom Schaf in einer Verdünnung von 1 : 1000 und nachfolgend als zweiter Antikörper das fluoreszierende Anti-Schaf-IgG/FITC in der Verdünnung von 1 : 16 aufgetragen. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ließen sich Spermatozoen mit intaktem, scharf abgegrenztem Akrosom von Spermatozoen mit Hofbildung unterscheiden. Bei den Spermatozoen mit Hofbildung war das Akrosin in die Umgebung diffundiert und ließ keine Identifizierung des Akrosoms mehr zu.

Zum anderen wurde die Beschaffenheit der äußeren akrosomalen Membran (OAM) des Spermatozoons geprüft. Hierzu wurde als erster Antikörper ein OAM-Antiserum von der Maus in einer Verdünnung von 1 : 500 verwendet. Dieser Antikörper heftet sich an die Antigene der äußeren akrosomalen Membran. Als zweiter Antikörper wurde das fluoreszierende Anti-Maus-IgG/FITC in einer Verdünnung von 1 : 16 aufgetragen. Es bindet an den ersten Antikörper und zeigt bei Unversehrtheit der Membran ein intaktes Akrosom. Läuft die Akrosomreaktion gerade ab, fluoreszieren nur noch Bruchstücke des Akrosoms. Bei bereits abgelaufener Reaktion ist im akrosomalen Abschnitt keine Fluoreszenz mehr zu sehen.

3.2.1.3. Vorbereitung des Ejakulats

Das frisch gewonnene Ejakulat wurde nach Verflüssigung und Erstellung des Spermio-gramms mit PBS-Puffer versehen und in drei Waschvorgängen vom Seminalplasma und von Verunreinigungen befreit. Hierzu wurde das Ejakulat im Verhältnis 1 : 9 mit PBS versetzt, gut durchmischt und bei 600 g zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und verworfen, das Pellet mit PBS-Puffer resuspendiert.

Nach dem dritten Waschvorgang wurde die Spermalösung geteilt. Die eine Hälfte wurde zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die andere Hälfte der Spermalösung wurde ebenfalls zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl 1%iger CTSA-Lösung versetzt. Von beiden Lösungen wurden je 20 µl abgenommen und je zwei Objektträger damit bestrichen. Die restlichen Lösungen wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt und zum Zeitpunkt 1, 3, 6 Stunden ebenfalls bearbeitet. Die bestrichenen Objektträger ließ man eine Stunde an der Luft trocknen. Zur Fixierung der Spermatozoen mußten sie 15 Minuten lang in 100%igem Methanol inkubiert werden.

3.2.1.4. Versuchsdurchführung

Die vorbereiteten Objektträger wurden 30 Minuten in PBS+BSA-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl-Portionen des jeweiligen ersten Antikörpers versehen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger dreimal je zehn Minuten in PBS-Puffer gewaschen, um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Puffer mußte für jede Waschung erneuert werden. Nun wurden die Objektträger mit je 100 µl-Portionen des zweiten zugehörigen Antikörpers versehen und zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Wiederum durch drei zehnmünütige Waschungen wurde der überschüssige Antikörper entfernt. Die Proben wurden mit PBS/Glycerin betropft und mit einem Deckglas bedeckt.

Innerhalb der nächsten Stunden wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet und photographiert. Auswerten und Photographieren sollten nicht zu lange hinausgezögert werden, da die Fluoreszenz kontinuierlich abnimmt.

3.2.1.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop. Von jeder Probe wurden willkürlich verschiedene Ausschnitte ausgewählt und photographiert, so daß insgesamt 100 Spermatozoen ausgezählt werden konnten.

Bei dem Versuch zur Akrosinfreisetzung erfolgte die Einteilung der Spermatozoen in drei Gruppen:

vollständig bzw. unvollständig reagierte Spermatozoen (in % der gesamten Spermatozoen)	- akrosomaler Bereich eindeutig differenzierbar - keine oder bruchstückhafte Fluoreszenz im akrosomalen Bereich
nicht reagierende Spermatozoen (in % der gesamten Spermatozoen)	- Intakte akrosomale Fluoreszenz
Spermatozoen mit Hofbildung (in % der gesamten Spermatozoen)	- keine eindeutige Differenzierung des akrosomalen Bereichs mehr möglich - Diffusion des Akrosins in die Umgebung

Die Hofbildung trat nicht bei allen Ejakulaten auf. Zeigten Ejakulate diese Erscheinung, war sie in den Proben ohne CTSA-Zusatz wesentlich ausgeprägter.

Bei dem Versuch zur Beurteilung der äußeren akrosomalen Membran beschränkte sich die Auswertung darauf, morphologische Veränderungen nachzuweisen, die den bei der Triple-Stain-Technik auftretenden Veränderungen entsprechen könnten. Diese Veränderungen stellten sich in der Immunfluoreszenz in einer Auftreibung und Vergrößerung des Spermatozoonkopfes dar. Bei allen derart veränderten Spermatozoen fehlte die Fluoreszenz im akrosomalen Bereich; die Spermatozoen besaßen keine äußere akrosomale Membran mehr.

Diese morphologischen Veränderungen traten signifikant nur bei CTSA-Zugabe auf. Die ausgewerteten Spermatozoen wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

- normal konfigurierte Spermatozoen (in % der Gesamtzahl)
- Spermatozoen mit besonderen Kopfveränderungen (in % der Gesamtzahl)

3.2.2. Versuchsanordnung zur Motilitätsmessung mit Hilfe der Dunkelfeldmethode

3.2.2.1. Vorbereitung des Ejakulats

Das frisch gewonnene Ejakulat wurde sofort nach Verflüssigung und Erstellung des Spermigramms in Reagenzgläser aufgeteilt und mit dem Waschpuffer TMPA+BSA im Verhältnis 1 : 10 versetzt. Nach guter Durchmischung im Rüttler wurden die Reagenzgläser fünf bis zehn Minuten bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und verworfen, das Pellet mit Waschpuffer resuspendiert und nach guter Durchmischung wiederholt zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit dem TMPA+HSA-Medium versetzt, das die Kapazitation induziert. Die Spermatozoenkonzentration wurde auf 60 - 80 Millionen/ml eingestellt.

Ein Teil der Spermalösung wurde mit dem Wirkstoff CTSA in gewünschter Konzentration versetzt. Die Spermalösung ohne CTSA bildete die Kontrollgruppe. Von beiden Gruppen wurden sofort je 5 µl für die Bestimmung der Motilität und je 200 µl für die Weiterverarbeitung in Triple-Stain-Technik abgenommen. Das übrige Sperma wurde bei 37°C im Brutschrank unter Begasung mit 5% CO₂ aufbewahrt.

Nur bei einem Gehalt von 5% CO₂ in der Atmosphäre konnte die Spermatozoensuspension auf dem pH von 7,4-7,8 gehalten werden. Bei längerem Stehen in Raumluft gibt das Natriumhydrogencarbonat des TMPA-Mediums zuviel CO₂ ab, so daß sein pH in den alkalischen Bereich steigt (pH 7,8-8,5). Die Akrosomreaktion ist aber pH-abhängig (7) und läuft bei alkalischem pH vorzeitig ab.

Nach einer Stunde, nach drei Stunden, nach sechs Stunden und nach neun Stunden im Brutschrank wurde von Test- und Kontrollgruppe jeweils eine weitere Portion für die Versuche abgenommen.

3.2.2.2. Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der Motilität erfolgte nach der mikrophotographischen Dunkelfeldmethode nach OVERSTREET et al. (1979), die durch das Einführen einer weiteren Vergrößerung geringgradig modifiziert wurde. Das Ausmessen der Schwimmbahnen und des "lateral head displacement" konnte dadurch erheblich erleichtert werden.

Verwendet wurde ein Phasenkontrastmikroskop mit Kamera von Olympus und die von MAKLER entwickelte Zählkammer, sog. Maklerkammer (47,54,55,56). Das im Mikroskop verwendete Objektiv erzeugte eine zehnfache Vergrößerung. Zwischen Mikroskop und Kamera war keine Linse dazwischengeschaltet. Für die Ablichtungen wurde ein Schwarz-Weiß-Film von Ilford (FP4, 125 ASA) benutzt.

Die Maklerkammer hat eine Dicke von 10 μm und zeigt ein Netz von zehn mal zehn Quadraten. Ein Quadrat hat die Größe von 100 μm mal 100 μm . Das ermöglicht durch Größenvergleich eine Ausmessung der Länge der Schwimmbahnen und der Breite des "lateral head displacement" der Spermatozoen.

Zur Konstanthaltung der Temperatur von 37°C während der Messung wurde ein Thermostat benutzt.

Die jeweilige 5 μl -Probe wurde mit einer Eppendorf-Pipette in die Maklerkammer eingeführt und mit einem Deckglas bedeckt. Bei jeder Probe wurden zwei verschiedene Bildausschnitte eingestellt und mit einer Belichtungszeit von einer Sekunde fotografiert. Der Weg, den die Spermatozoen in einer Sekunde zurücklegen, zeichnete sich auf den Bildern deutlich ab.

Vorwärts bewegliche Spermatozoen hinterließen wellenartige oder zickzackförmige Linien mit verschiedener Amplitude. Die Länge der zurückgelegten Strecke entsprach der Geschwindigkeit. Das Ausmaß der Wellenamplitude ließ die hyperaktivierten Spermatozoen erkennen. Wellenförmige Bewegungen, deren Amplituden 10 μm betrugen, wurden als Wiplash-Bewegungen gedeutet.

Unbewegliche Spermatozoen waren teils deutlich als solche zu identifizieren, teils stellte sich der Kopf als Punkt ohne erkennbaren Schwanz dar. Hier war die Identifizierung erschwert.

Ortsbewegliche Spermatozoen, also Spermatozoen, deren Schwanz zwar in Bewegung ist, die aber keine Ortsänderung erfahren, stellten sich als größere unscharfe Punkte dar. Auch hier war die Identifizierung und Unterscheidung von Verunreinigungen (Leukocyten, Rundzellen) schwierig.

Zur Auswertung wurden die Filmnegative gerahmt und mit einem Diaprojektor auf einen Schirm projiziert, was eine weitere Vergrößerungswirkung hatte. Insgesamt wurde so eine 500-fache Vergrößerung erreicht.

3.2.2.3. Auswertung

Von jeder Probe wurden mindestens 200 Spermatozoen ausgezählt.

Zuerst wurden die Spermatozoen nach ihrer Beweglichkeit in zwei Gruppen eingeteilt:

- Zahl der vorwärts beweglichen Spermatozoen (in % der gesamten Spermatozoen)
- Zahl der unbeweglichen Spermatozoen (in % der gesamten Spermatozoen)

Die ortsbeweglichen Spermatozoen wurden wegen der Schwierigkeit ihrer Identifizierung vernachlässigt.

Im zweiten Schritt wurde die mittlere Geschwindigkeit der vorwärts beweglichen Spermatozoen festgestellt. Dazu wurde die Länge der Schwimmbahn jedes beweglichen Spermatozoons mit Hilfe eines Entfernungsmessers für Landkarten ausgemessen. Alle Längenmessungen wurden addiert und der Mittelwert bestimmt. Nach Berücksichtigung der Vergrößerungen konnte so die durchschnittliche Geschwindigkeit der vorwärts beweglichen Spermatozoen in μm pro Sekunde errechnet werden.

Zuletzt wurden die vorwärts beweglichen Spermatozoen auf die Breite ihrer Wellen-amplitude untersucht. Betrug das "lateral head displacement" mehr als $10 \mu\text{m}$, wurden sie als Spermatozoen mit Wiplash-Bewegung eingeordnet. Diese Spermatozoen wurden ebenfalls ausgezählt und ihre Anzahl in % der vorwärts beweglichen Spermatozoen angegeben.

3.2.3. Versuchsanordnung zur Beurteilung der Akrosomreaktion mit Hilfe der Triple-Stain-Technik

3.2.3.1. Prinzip der Färbung

Die Triple-Stain-Technik wurde 1981 von TALBOT und CHACON beschrieben und basiert auf drei Färbungen.

Der supravitale Farbstoff Trypanblau färbt nur bei toten Spermatozoen die postakrosomale Region dunkelblau bis schwarz an und erlaubt so eine erste Unterscheidung in tote und lebende Spermatozoen. Bei lebenden Spermatozoen kann Trypanblau nicht eindringen; die postakrosomale Membran dieser Spermatozoen wird in der weiteren Färbung mit Bismarck-Braun hellbraun angefärbt.

Der Zustand des Akrosoms kann durch die Färbung mit Bengal-Rosa beurteilt werden. Nur das intakte Akrosom färbt sich rosa an; ist die Akrosomreaktion bereits abgelaufen, bleibt die akrosomale Region weiß.

3.2.3.2. Vorbereitung des Ejakulats

Die Vorbereitung des Ejakulats bestand hauptsächlich in der Reinigung und Einstellung der benötigten Spermatozoenkonzentration und wurde bereits unter 3.2.2.1. ausführlich beschrieben. Wie erwähnt, wurde eine Hälfte des aufbereiteten Spermas in der gewünschten Konzentration mit CTSA versetzt, während die übrige Spermalösung ohne CTSA-Zusatz als Kontrollgruppe diente. Von jeder Gruppe wurden sofort nach Aufbereitung 200 µl für die Bearbeitung in Triple-Stain-Technik abgenommen, die restliche Lösung, wie beschrieben, im Brutschrank aufbewahrt.

3.2.3.3. Durchführung der Färbung

Die 200 µl-Portionen wurden in Eppendorfhütchen pipettiert und sofort mit dem gleichen Volumen 2%iger Trypanblaulösung versetzt. Nach guter Durchmischung im Rüttler folgte eine 15-minütige Inkubation im Wasserbad bei 35-37°C. Anschließend wurde das Trypanblau mit Waschpuffer (TPMA-BSA-Medium) in zwei bis drei Waschvorgängen ausgewaschen. Dazu wurden die Eppendorfhütchen mit Waschpuffer aufgefüllt und bei 600 g 5-10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und verworfen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet mit 1%iger Glutaraldehydlösung versetzt, um die gefärbten Spermatozoen zu fixieren und 30-60 Minuten lang im Wasserbad inkubiert (Fixierbad). Das Glutaraldehyd wurde mit deionisiertem Wasser in zwei Waschvorgängen ausgewaschen. Die fixierten Spermatozoen wurden auf Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet.

Die weitere Färbung mit Bismarck-Braun und Bengal-Rosa konnte zu einem späteren, beliebigen Zeitpunkt durchgeführt werden.

Die Färbung mit Bismarck-Braun muß bei 40°C erfolgen, die Färbung mit Bengal-Rosa bei Raumtemperatur.

Zuerst wurden die mit den Spermatozoen beschichteten Objektträger fünf Minuten in der Bismarck-Braun-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Farbe mit deionisiertem Wasser ausgewaschen.

Dann folgte die Färbung mit Bengal-Rosa. Die Objektträger wurden 20-45 Minuten in dem Färbegrad belassen und anschließend ebenfalls mit deionisiertem Wasser gründlich ausgewaschen.

Sie wurden durch kurzes Eintauchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%-70%-96%) getrocknet und durch ein Bad in Xylol gereinigt. Nach Bedecken mit einem Deckglas erfolgte die Auswertung unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung.

3.2.3.4. Auswertung

Unter dem Phasenkontrastmikroskop kann man bei 1000-facher Vergrößerung Spermatozoen in vier verschiedenen Färbemustern erkennen.

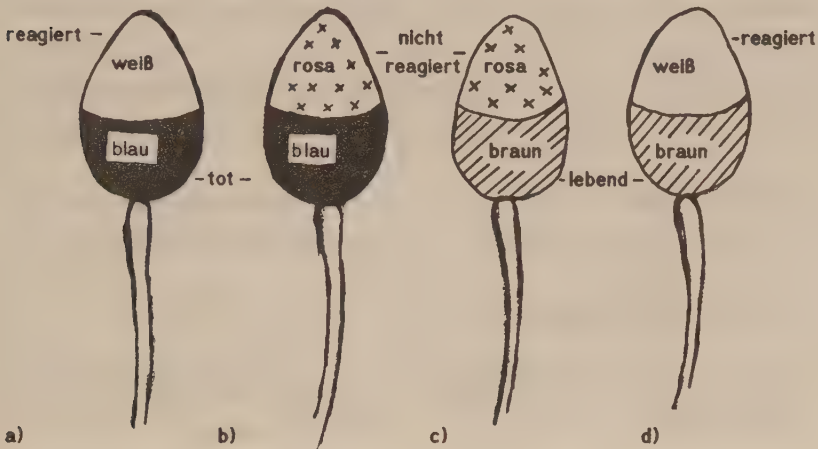


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der mit Triple-Stain-Technik gefärbten Spermatozoen

a) und b) zeigen tote Spermatozoen. Bei den meisten toten Spermatozoen bleibt die akrosomale Region weiß. Das deutet auf eine stattgefundene Akrosomreaktion hin und ist bei unbeweglich gewordenen und abgestorbenen Spermatozoen als postmortale Änderung zu bewerten (92).

c) und d) zeigen lebende Spermatozoen. Reagierte Spermatozoen zeichnen sich durch ein weiß gebliebenes Akrosom (a) oder durch starke, gut erkennbare Vesikulation aus.

Bei unreaktierten Spermatozoen ist das Akrosom kräftig rosa angefärbt (b,c).

Zu jeder Probe wurde ein Objektträger ausgewertet. Dabei wurden verschiedene Ausschnitte zufällig eingestellt und alle Spermatozoen bis zu einer Gesamtzahl von 400 ausgezählt.

Die morphologisch intakten Spermatozoen wurden nach ihren Färbemustern zunächst in drei Gruppen eingeteilt:

- | | |
|--|---|
| 1. lebende Spermatozoen mit
abgelaufener Akrosomreaktion
in % der gesamten Spermatozoen) | - die postakrosomale Region ist braun
- die akrosomale Region ist weiß |
|--|---|

In diese Gruppe werden auch die Spermatozoen, die eine starke Vesikulation am Akrosom zeigen, eingeordnet. Die Reaktion ist hier gerade im Begriff, abzulaufen.

- | | |
|---|---|
| 2. lebende Spermatozoen, deren Akro-
somreaktion noch nicht abgelaufen
ist (Akrosom intakt)
(in % der gesamten Spermatozoen) | - die postakrosomale Region ist braun
- das Akrosom ist kräftig rosa |
|---|---|

- | | |
|--|--|
| 3. tote Spermatozoen (in % der gesamten
Spermatozoen) | - die postakrosomale Region ist
tiefblau bis schwarz
- das Akrosom ist bei den meisten
toten Spermatozoen tiefblau bis
schwarz oder weiß (postmortale
Veränderung); in seltenen Fällen
sind auch Spermatozoen mit intak-
tem Akrosom zu sehen, das sich
dann rosa anfärbt. |
|--|--|

Eine Sondergruppe wurde nach der Betrachtung der Objektträger mit CTSA-behandeltem Sperma eingeführt:

- Spermatozoen, deren Köpfe eine besondere morphologische Veränderung aufweisen

Bei mit CTSA-versetztem Sperma kommt es auffällig häufiger als bei unbehandelten Spermatozoen zu einer schwammigen Auftreibung und letztendlich Auflösung des gesamten Kopfes. Es beginnt mit einer Vergrößerung und einer Lösung des Kopfes vom Schwanz. Dann kommt es zu einer wolkenartigen Auftreibung und einem Auseinanderfließen des aufgelösten Kopfes. In welchem Abschnitt, ob akrosomal oder postakrosomal, diese Veränderungen beginnen, ist nicht eindeutig zu bestimmen.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

Die vorliegenden Untersuchungen sollten zeigen, ob CTSA Einfluß auf die verschiedenen, bei der Befruchtung notwendigen Abläufe hat. Bei den einzelnen Versuchsanordnungen wurde auf die für eine statistische Auswertung erforderliche Anzahl verzichtet. Die Auswirkungen von CTSA wurden in einzelnen Fällen bzw. Fallgruppen dargestellt.

4.1. Immunfluoreszenz

4.1.1. Untersuchung zur Akrosinfreisetzung mittels α -Akrosin-Antikörper

Um den Einfluß von 1%igem CTSA auf die Akrosinfreisetzung nachzuweisen, wurden Untersuchungen an einer Spendergruppe und an einer Patientengruppe durchgeführt.

4.1.1.1. Ergebnisse der Spendergruppe

Die Spendergruppe umfaßte vier Ejakulate; bei zweien davon war der Spender erwiesenermaßen fertil. Die Spermioogramme fielen der Norm entsprechend aus. Durch die Triple-Stain-Technik wurde in vorherigen Untersuchungen ein Ablauf der Akrosomreaktion nachgewiesen.

Die Kontrollproben ohne CTSA zeigten im Ablauf der Akrosomreaktion eine starke Abnahme der Spermatozoen mit intaktem Akrosom (von 67% auf circa 15%).

Die Zahl der Spermatozoen mit Diffusionshöfen, die durch die Freisetzung des Akrosins in die Umgebung entstanden, stieg im Verlauf stetig an (von 24% auf circa 63%).

Diese Kinetik der Akrosinfreisetzung stimmt mit der Kinetik der Akrosomreaktion, wie sie bei der Triple-Stain-Technik erfasst wird, weitgehend überein.

Abbildung 6 zeigt am Beispiel eines fertilen Spenders die Akrosinfreisetzung mittels α -Akrosin-Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz.

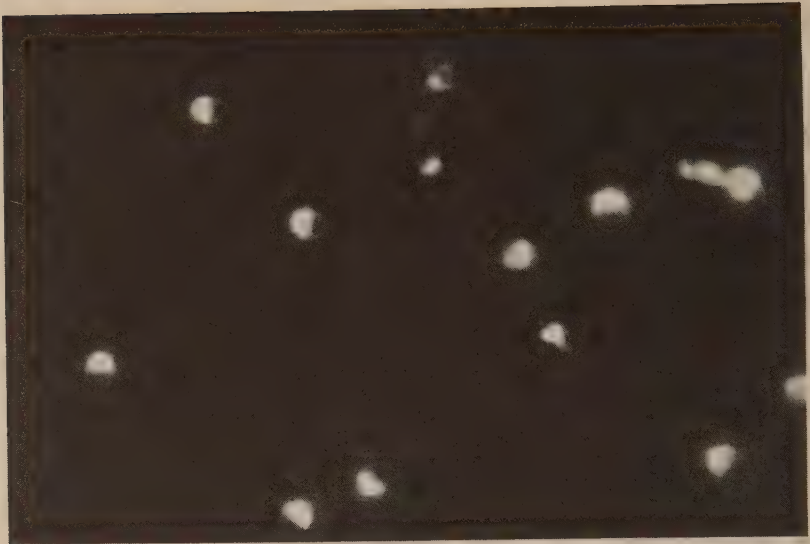


Abbildung 6 a: Zeit $t=0$: fast alle Spermatozoen zeigen ein intaktes Akrosom



Abbildung 6 b: Zeit $t = 3$ Stunden: es sind intakte, unreaktierte Spermatozoen, Übergangsformen (vergrößerte Spermatozoonköpfe) und bereits reagierte Spermatozoen mit Freisetzung des Akrosins in die Umgebung sichtbar

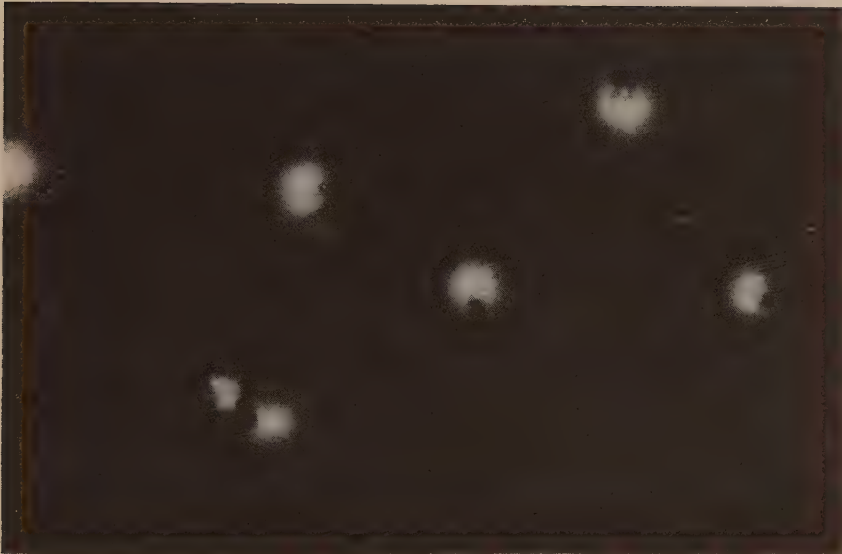


Abbildung 6 c: Zeit $t = 6$ Stunden: hier sind alle Spermatozoen bereits reagiert und zeigen eine Freisetzung des Akrosins in die Umgebung

Abbildung 6: Nachweis der Akrosinfreisetzung mit Hilfe von α -Akrosin-Antikörpern
in der indirekten Immunfluoreszenz am Beispiel eines fertilen Spenders
in der Kontrollgruppe (a: $t=0$; b: $t=3$ Std.; c: $t=6$ Std.)

Im Vergleich dazu verzögerte sich bei den Testproben mit 1%igem CTSA-Zusatz der Ablauf der Akrosinfreisetzung. Nach sechs Stunden waren bei einem Ausgangswert von 87% noch 50% der Spermatozoen unreaigiert. Ebenso wurde die Halo-Bildung, also die Freisetzung des Akrosins in die Umgebung, signifikant gehemmt. Sie fand zwar statt, erreichte nach sechs Stunden aber erst einen Wert von circa 12% (vergleiche Kontrolle ca. 63%).

Hier scheint CTSA sogar einen stabilisierenden Effekt auf die Membranen des Spermatozoons, vor allem die des Akrosoms zu haben. Der stabilisierende Effekt geht allerdings nicht soweit, daß eine Akrosomreaktion ganz verhindert würde, wie die Anzahl der Zwischenformen der in Reaktion befindlichen Spermatozoen zeigt (circa 40% im 3- und im 6-Stunden-Wert). Die Akrosomreaktion wird lediglich verzögert.

Ein vorzeitiger Ablauf der Akrosomreaktion wird durch CTSA-Zusatz von 1% zusätzlich erschwert.

Abbildung 7 gibt die Akrosinfreisetzung (Halo-Bildung) und die Abnahme der Spermatozoen mit intaktem Akrosom bei CTSA-Zugabe von 1% und in der Kontrolle wieder.

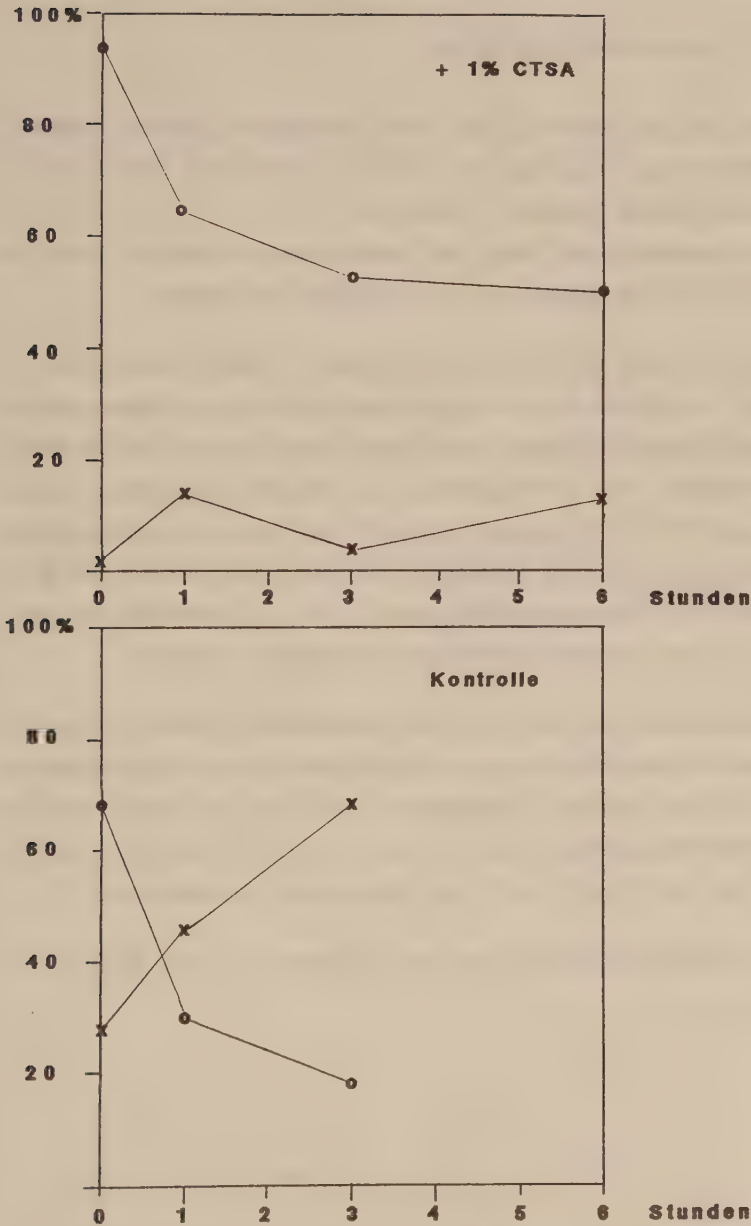


Abbildung 7: Verhalten der Spermatozoen mit Halo-Bildung (x-x) und der Spermatozoen mit intaktem Akrosom (o-o) in der Spendergruppe (n = 4) bei der indirekten Immunfluoreszenz mit Verwendung von α -Akrosin-Antikörpern

4.1.1.2. Ergebnisse der Patientengruppe

Die Patientengruppe umfaßte Ejakulate aus der andrologischen Ambulanz. In Spermatozoendichte, Anzahl der pathologischen Zellen und Anzahl der toten Zellen (Eosintest) zeigten alle Patienten weitgehend Normalbefunde.

Da die Ergebnisse in der Kinetik der Akrosinfreisetzung variierten, wurde der Einfluß von CTSA an den einzelnen, unterschiedlichen Fällen diskutiert.

Eine deutliche Kinetik der Akrosinfreisetzung zeigte der Patient 1428/85 (siehe Abbildung 8). Im Zeitraum von sechs Stunden fielen die intakten Spermatozoen von 75% auf 38%. Die vollständig reagierten Spermatozoen stiegen in derselben Zeit von 9% auf 30%. Gleichzeitig konnte in diesem Ejakulat eine Halo-Bildung nachgewiesen werden. Nach sechs Stunden Versuchsdauer zeigten 23% der Spermatozoen Diffusionshöfe (der niedrige Wert in der 3-Stunden-Probe läßt sich dadurch erklären, daß große Zeitsprünge in der Probenuntersuchung gemacht werden und zu diesem Entnahmezeitpunkt sich mehr Spermatozoen noch in den Zwischenstufen befanden).

Im Gegensatz dazu wurde bei CTSA-Zugabe die Halo-Bildung gehemmt. Sie trat erst nach sechs Stunden auf und nur bei circa 2% der Spermatozoen. Auch der Ablauf der Akrosomreaktion unterblieb beziehungsweise verzögerte sich (könnte außerhalb des Untersuchungszeitraums aufgetreten sein). Bei einem Ausgangswert von 11% waren nach sechs Stunden erst 20% der Spermatozoen vollständig reagiert.

Dieses Ejakulat zeigte in seinem Verhalten Übereinstimmung mit den Ejakulaten der Spendergruppe.

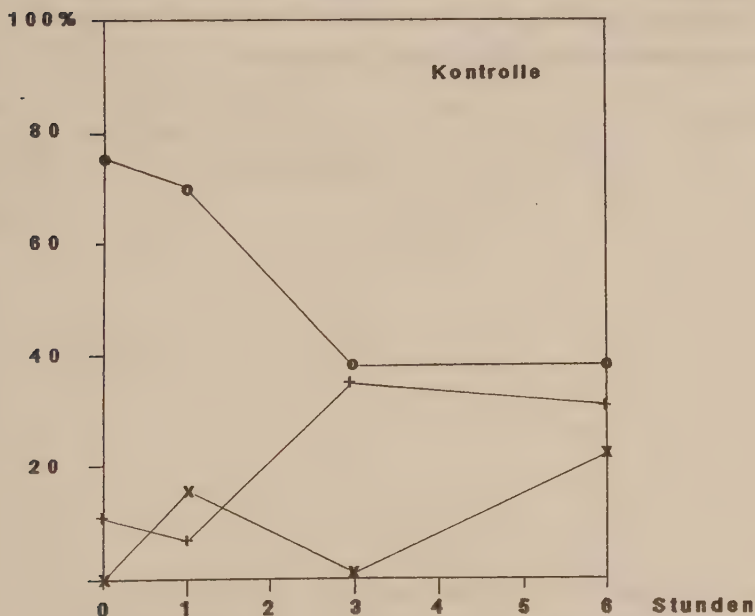
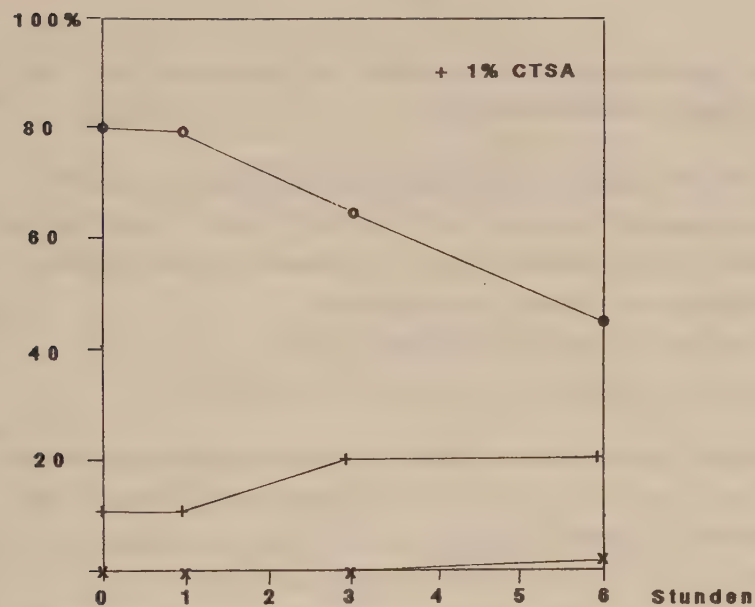


Abbildung 8: Halo-Bildung (x-x), Abnahme der intakten Spermatozoen (o-o) und Zunahme der reagierten Spermatozoen (+-) mittels indirekter Immunfluoreszenz mit α -Akrosin-Antikörpern bei Patient 1428/85

Bei den folgenden Patienten fand in der Kontrolle zwar eine Akrosomreaktion statt, jedoch abgeschwächt oder verlangsamt.

Patient 1410/85 zeigte in der Kontrolle innerhalb der ersten Stunde eine Zunahme der vollständig reagierten Spermatozoen von 13% auf 25%. Im weiteren Verlauf blieb die Anzahl der vollständig reagierten Spermatozoen weitgehend konstant, während bei den Zwischenformen ein Anstieg zu verzeichnen war.

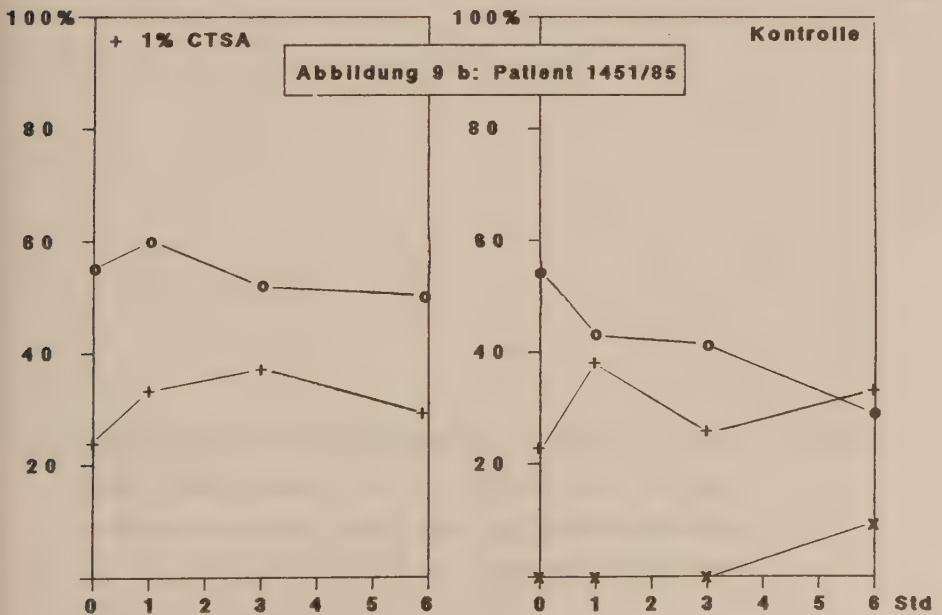
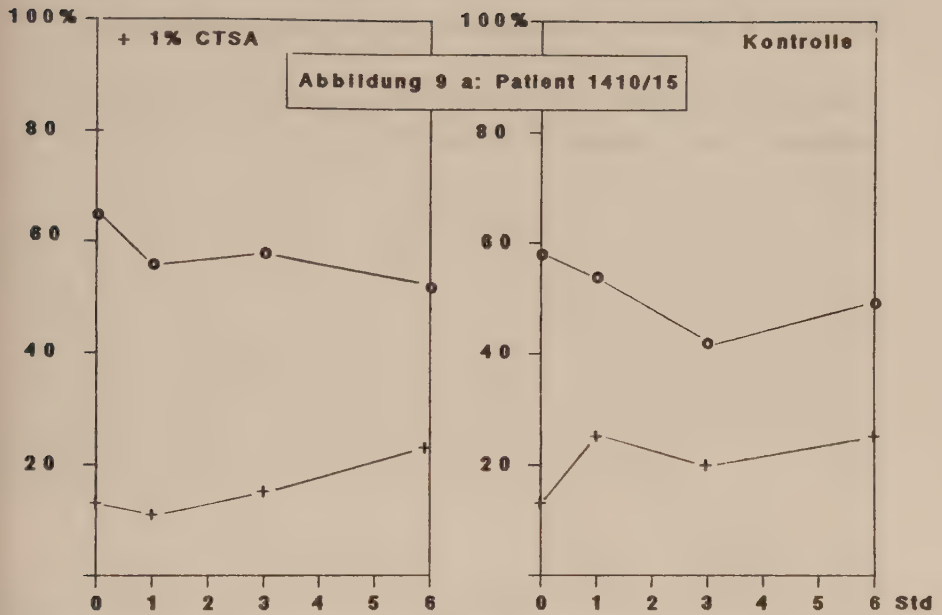
Bei CTSA-Zugabe fand keine Akrosomreaktion mehr statt.

Eine Halo-Bildung trat in diesem Ejakulat nicht auf (Abbildung 9 a).

Patient 1451/85 zeigte ebenfalls einen Anstieg der vollständig reagierten Spermatozoen in der ersten Stunde, hier von 21% auf 38%. Die Zahl der vollständig reagierten Spermatozoen blieb im weiteren Verlauf ziemlich stabil. Die intakten Spermatozoen nahmen von 54% auf 27% ab. Im 6-Stunden-Wert trat eine Halo-Bildung von 9% auf.

Unter CTSA-Zusatz verflachte die Kurve der intakten Spermatozoen (Abbildung 9 b). Eine Akrosomreaktion war nicht mehr eindeutig nachweisbar.

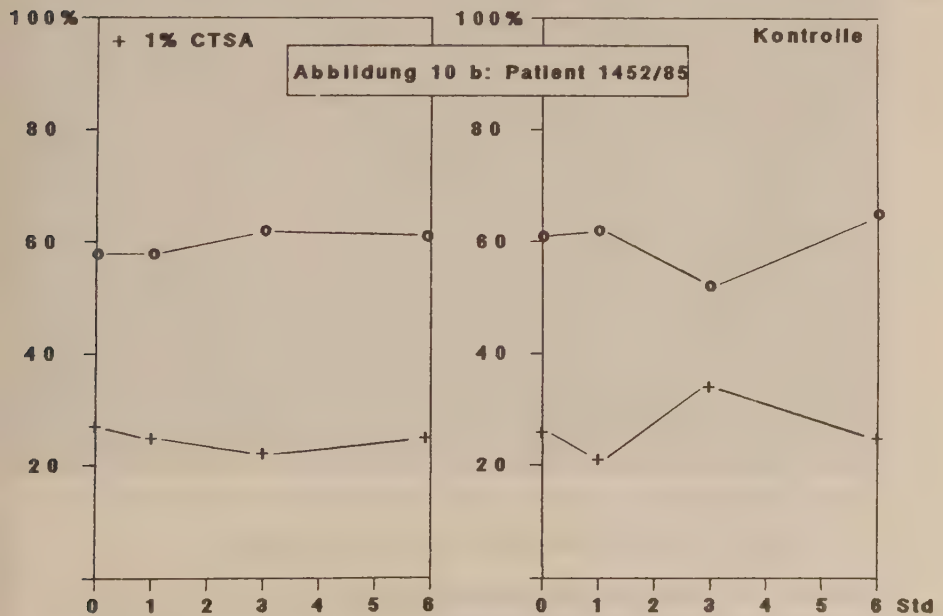
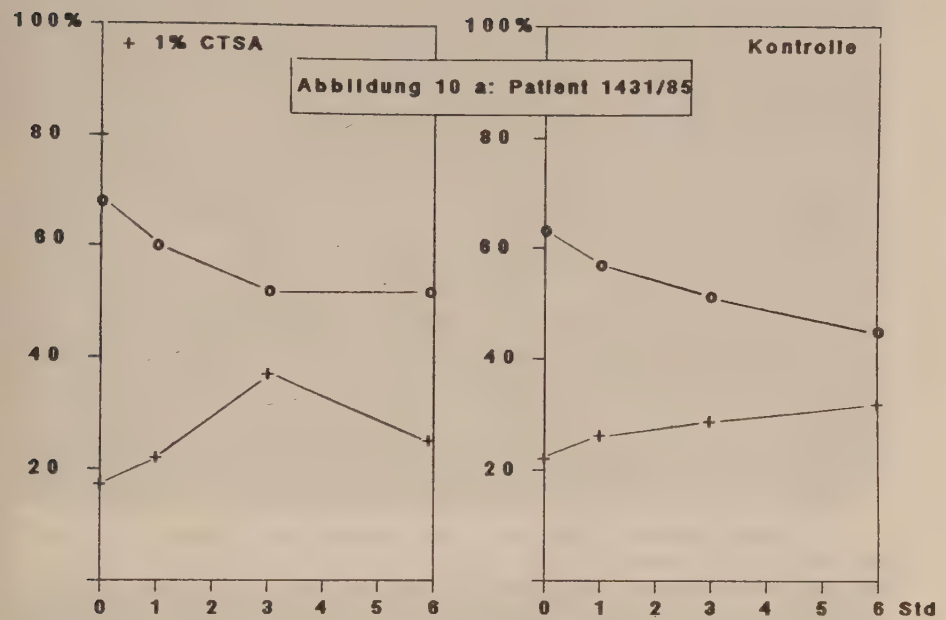
Abbildung 9 : Halo-Bildung (x-x), Abnahme der intakten Spermatozoen (o-o) und Zunahme der reagierten Spermatozoen (+--+) mittels Immunfluoreszenz bei Patient 1410/85 (Abbildung 9 a) und bei Patient 1451/85 (Abbildung 9 b).



Zwei Patienten (1431/85; 1452/85) zeigten innerhalb der Untersuchungszeit von sechs Stunden keine Akrosomreaktion. Auch bei CTSA-Zugabe änderte sich daran nichts (Abbildung 10 a und 10 b). In diesen Ejakulaten fand auch keine Halo-Bildung statt.

Abschließend läßt sich sagen, daß CTSA nur bei Ejakulaten, die eine Akrosomreaktion durchlaufen, zu einer Veränderung in der Kinetik führt.

Abbildung 10: Verhalten der intakten Spermatozoen (o-o) und der vollständig reagierten Spermatozoen (+--) in der Immunfluoreszenz mittels α -Akrosin-Antikörpern bei Patient 1431/85 (Abbildung 10 a) und bei Patient 1452/85 (Abbildung 10 b)



4.1.2. Untersuchung zur Integrität der äußeren akrosomalen Membran der Spermatozoen mittels OAM-Antikörper

Der Einfluß von 1%igem CTSA auf die äußere akrosomale Membran wurde an Spender-Ejakulaten untersucht.

Dabei wurde darauf geachtet, ob sich bei CTSA-Zugabe morphologische Änderungen zeigten, die den bei der Triple-Stain-Technik wahrgenommenen Veränderungen entsprechen könnten.

Tatsächlich traten, vor allem bei längerer Einwirkung von CTSA Spermatozoen auf, deren Köpfe vergrößert waren und in der akrosomalen Region keine Fluoreszenz mehr zeigten (Abbildung 12). Im fortgeschrittenen Stadium kam es zu einer Loslösung des Kopfes vom Schwanz; die Identifizierung wurde dadurch erschwert.

Unter Zugabe von 1% CTSA ergab sich ein Anstieg der deformierten Spermatozoen von 12,5% bei Versuchsbeginn auf 28,3% nach sechs Stunden (Abbildung 11).

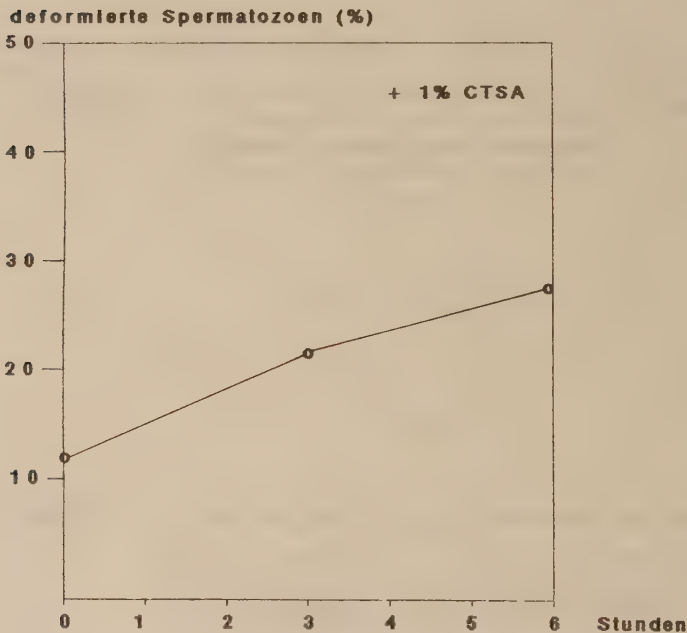


Abbildung 11: Die Durchschnittswerte der deformierten Spermatozoen aus drei Proben (n = 3) in der indirekten Immunfluoreszenz mittels OAM-Antikörpern bei Zugabe von 1% CTSA



Zeit $t = 0$: bei den meisten Spermatozoen ist die äußere akrosomale Membran vor-



Zeit $t = 6$ Stunden: bei fortgeschrittener CTSA-Einwirkung treten die beschriebenen Kopfveränderungen auf; die akrosomalen Membranen fehlen

Abbildung 12: Beurteilung der äußeren akrosomalen Membran (OAM) mittels OAM-Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz

4.2. Spermatozoenmotilität

Unter verschiedenen Konzentrationen von CTSA wurden die Abnahme der vorwärts beweglichen Spermatozoen, ihre mittlere Geschwindigkeit und die Anzahl der hyperaktivierten Spermatozoen (Spermatozoen mit Wiplash-Bewegung) ausgewertet. Die Ejakulate stammten durchwegs von Patienten.

Abbildung 13 zeigt die Darstellung der Spermatozoen in der Maklerkammer zur Beurteilung von Motilität, mittlerer Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung.

- unbewegliche Spermatozoen sieht man als Punkte, teils ist sogar der Schwanz erkennbar
- ortsbewegliche Spermatozoen stellen sich als größere unscharfe Punkte dar, leicht zu verwechseln mit Verunreinigungen (Rundzellen, Leukozyten)
- vorwärts bewegliche Spermatozoen zeigen wellenartige oder zickzackförmige Linien
- eine Wellenamplitude größer als 10 μm bezeichnet man als Wiplash-Bewegung; sie spricht für die Hyperaktivtion der Spermatozoen
- die Länge der zurückgelegten Strecke entspricht der Geschwindigkeit des Spermatozoons

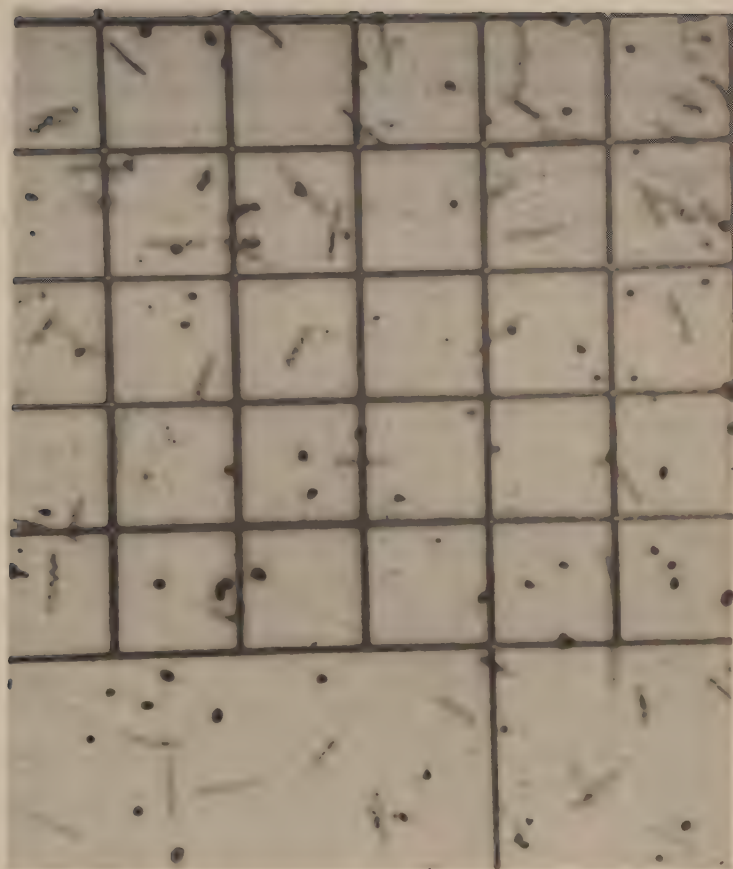


Abbildung 13: Zur Beurteilung von Motilität, mittlerer Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung

4.2.1. Die Kontrollproben

Die Kontrollproben ($n=9$) zeigen eine relativ konstante Kurve für den Verlauf der vorwärts beweglichen Spermatozoen und für ihre Durchschnittsgeschwindigkeit über einen Versuchszeitraum von neun Stunden. In Bezug auf die Wiplash-Bewegung ergaben sich verschiedene Tendenzen. So kam es teils zu einer stetigen Zunahme der Wiplash-Bewegung (3 Proben), teils zu einem Absinken (3 Proben) beziehungsweise eher gleichbleibendem Verlauf (3 Proben).

In Abbildung 14 sind die Verläufe der Motilität und der mittleren Geschwindigkeit in den Kontrollen dargestellt.

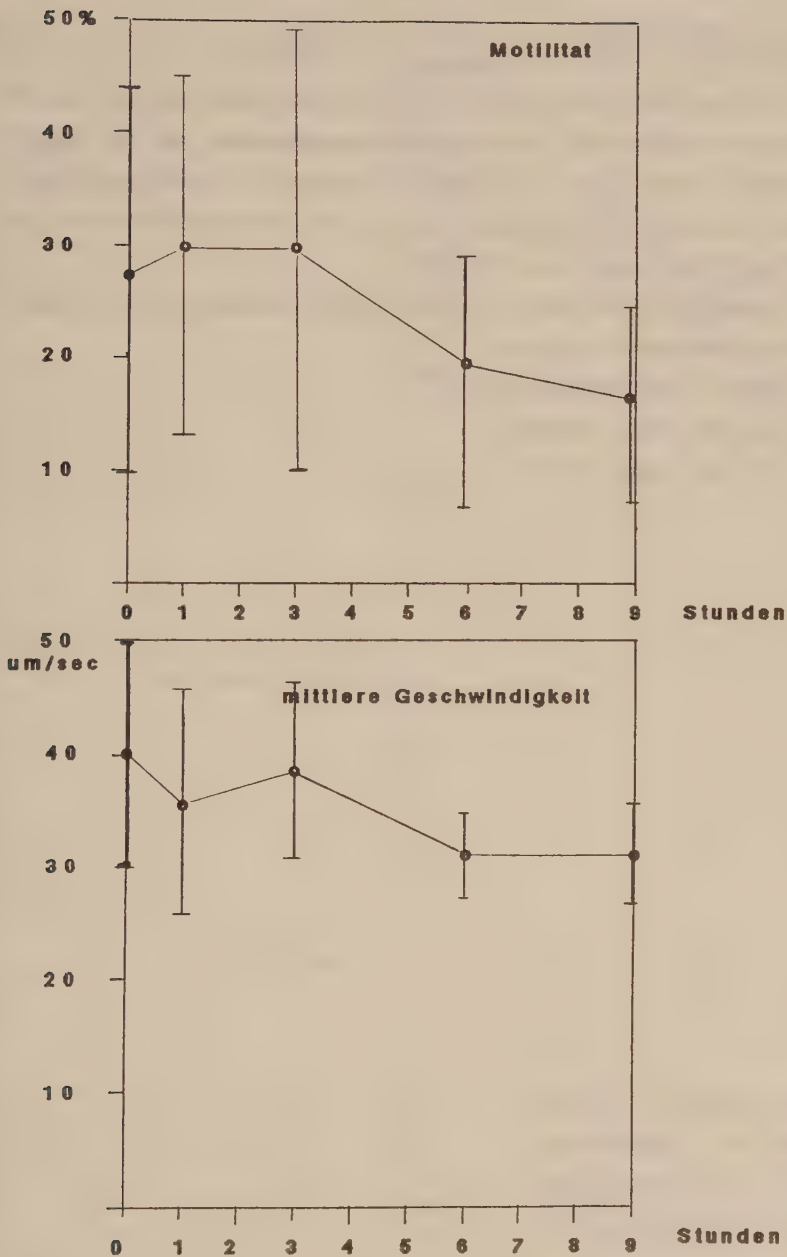


Abbildung 14: Motilität und mittlere Geschwindigkeit der Kontrollproben; aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus neun Kontrollen (n = 9)

4.2.2. Die Testproben

Zusätze von 0,0001%, von 0,5% und von 1,7% CTSA hatten keinen Einfluß auf die Zahl der motilen Spermatozoen, ihre Durchschnittsgeschwindigkeit oder die Wiplash-Bewegung. Mit dem Zusatz von 0,0001% CTSA wurden drei Versuche durchgeführt. Eine Zugabe von 0,5% CTSA wurde in vier Versuchen ausgetestet. Die Erprobung von 1,7%igem CTSA erfolgte in zwei Versuchen.

Abbildung 15 zeigt Beispiele für Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei einem Zusatz von

- a) 0,0001% CTSA (Patient 1686/85)
- b) 0,5% CTSA (Patient 1753/85)
- c) 1,7% CTSA (Patient 1028/85)

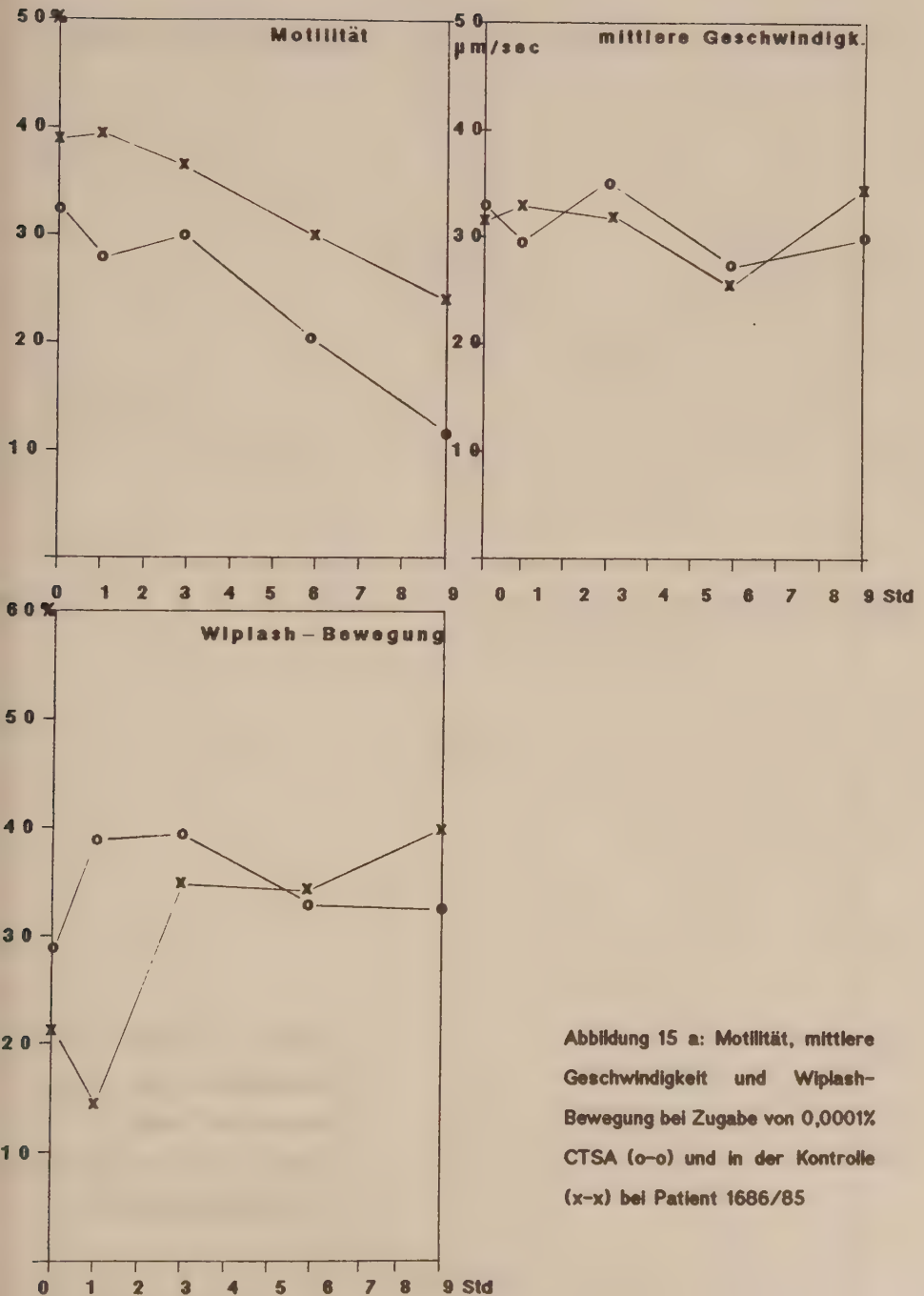


Abbildung 15 a: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 0,0001% CTSA (o-o) und in der Kontrolle (x-x) bei Patient 1686/85

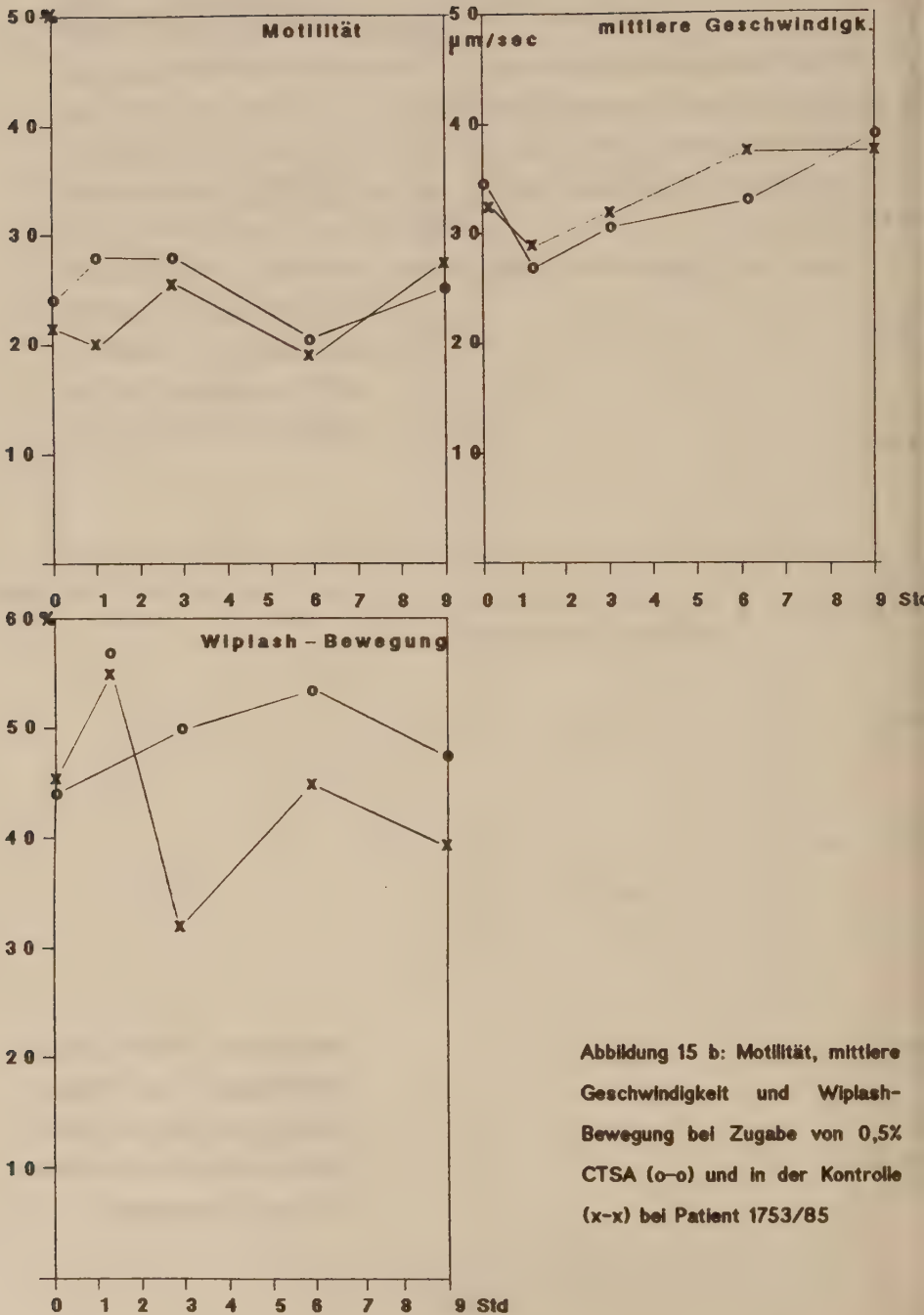


Abbildung 15 b: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 0,5% CTSA (o-o) und in der Kontrolle (x-x) bei Patient 1753/85

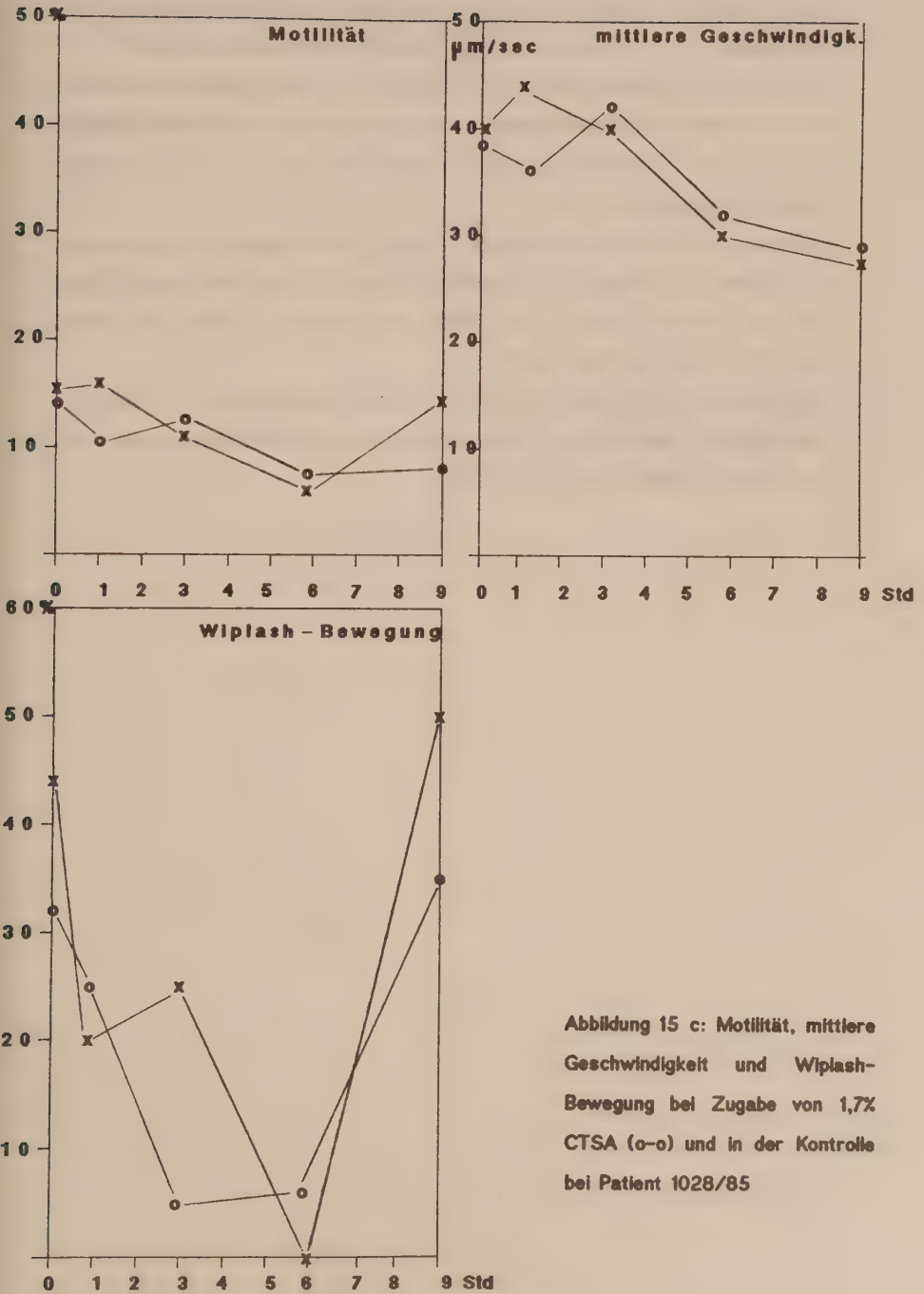


Abbildung 15 c: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 1,7% CTSA (o-o) und in der Kontrolle bei Patient 1028/85

Erst ein Einsatz von 5%igem CTSA bewirkte eine sichtbare Veränderung aller Motilitätsparameter. Drei Versuche wurden mit dieser Konzentration durchgeführt.

Die vorwärts beweglichen Spermatozoen zeigten im Test deutlich niedrigere Werte als in der Kontrolle. Auch die durchschnittliche Geschwindigkeit und die Wiplash-Bewegung wurden von Versuchsbeginn an gehemmt. Die Wiplash-Bewegung trat nach spätestens sechs Stunden nicht mehr auf.

Trotz der teils erheblichen Motilitätsminderung von Versuchsbeginn an kam es auch im Verlauf von neun Stunden nicht zu einem völligen Absterben aller Spermatozoen. Nach neun Stunden konnten in allen Fällen noch lebendige, vorwärts bewegliche Spermatozoen nachgewiesen werden.

Abbildung 16 zeigt die Verläufe von Motilität, mittlerer Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung unter Einwirkung von 5%igem CTSA und die dazugehörigen Kontrollen bei drei Patienten (1686/85; 1671/85; 1637/85).

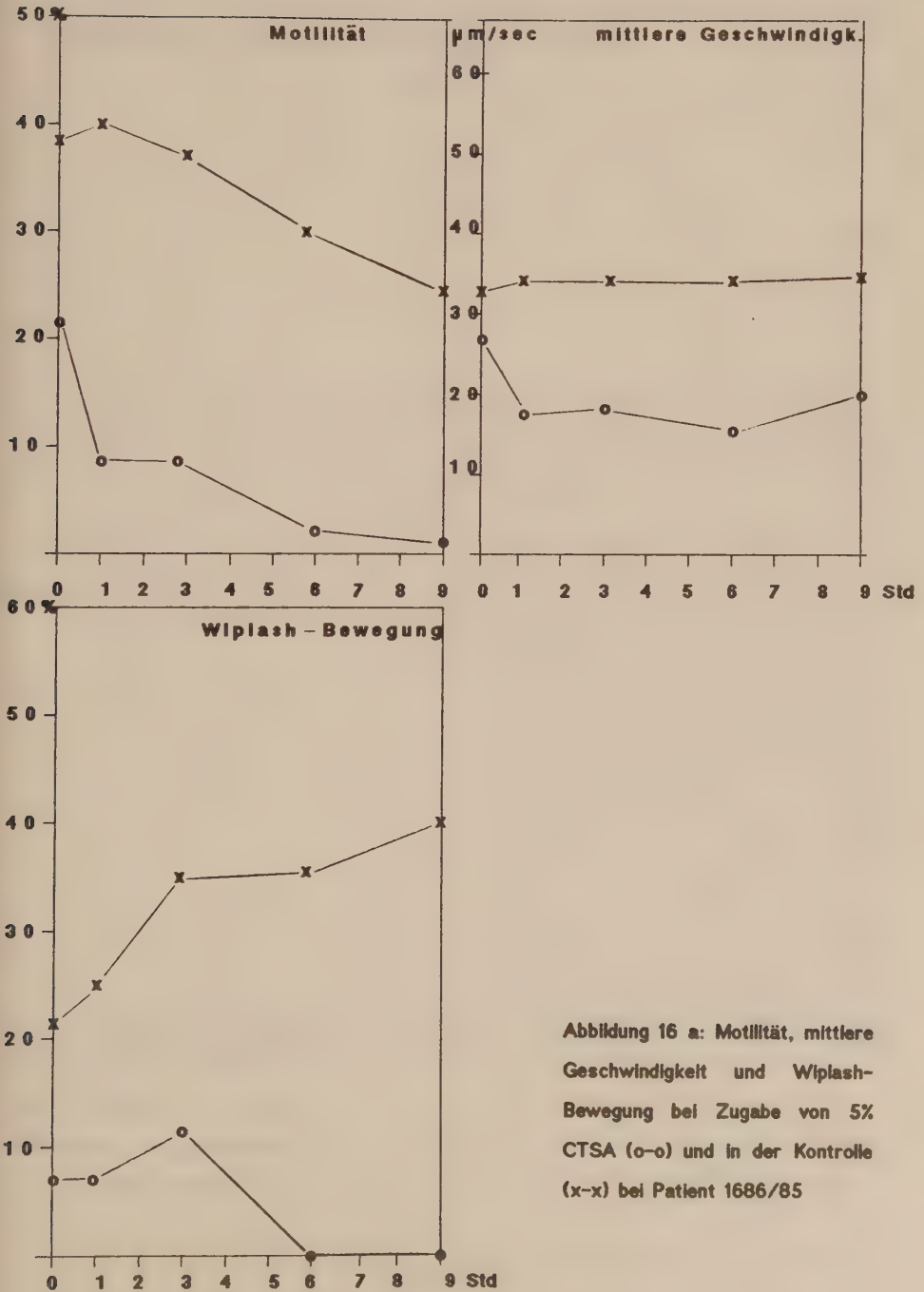


Abbildung 16 a: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 5% CTSA (o-o) und in der Kontrolle (x-x) bei Patient 1686/85

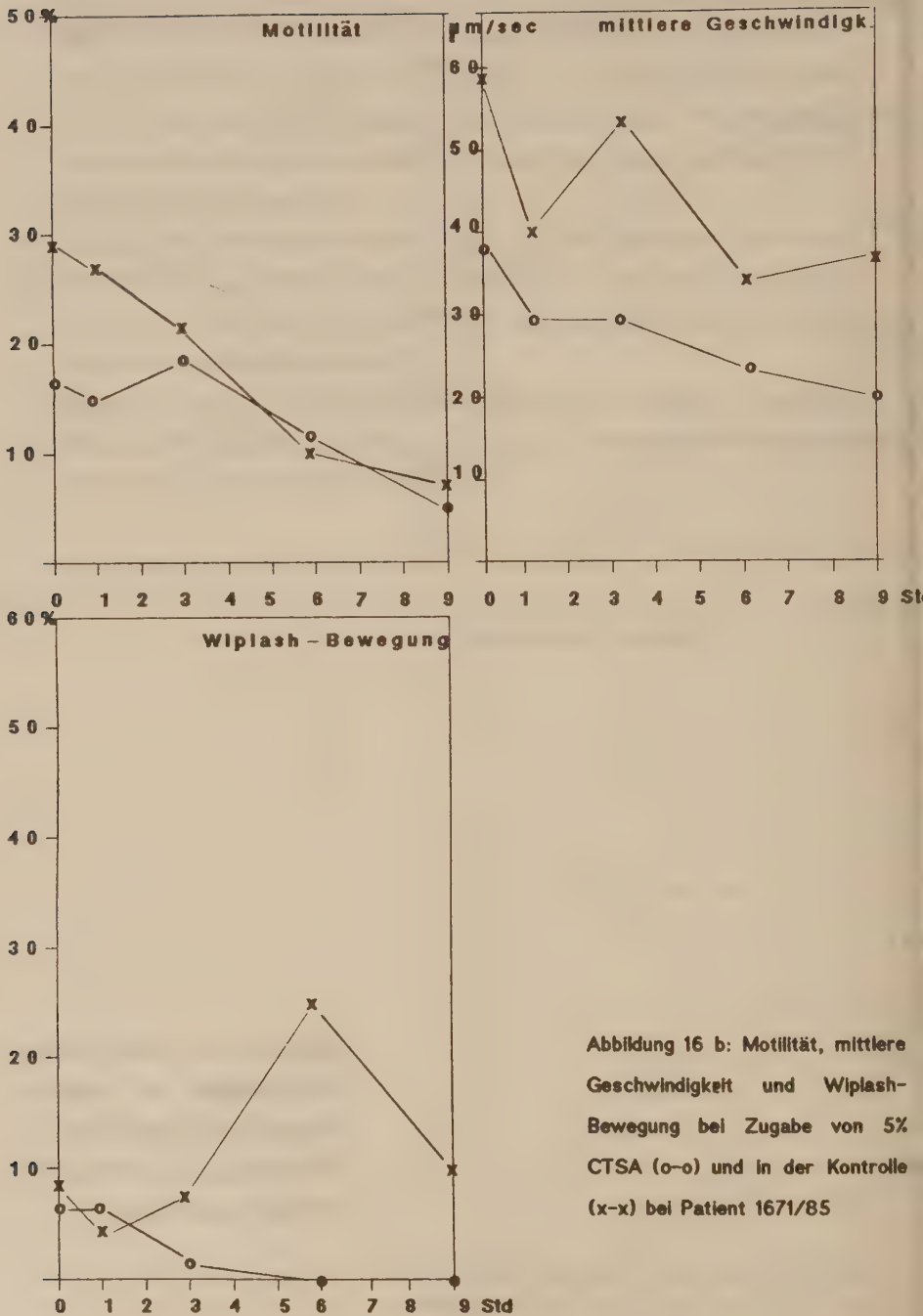


Abbildung 16 b: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 5% CTSA (o-o) und in der Kontrolle (x-x) bei Patient 1671/85

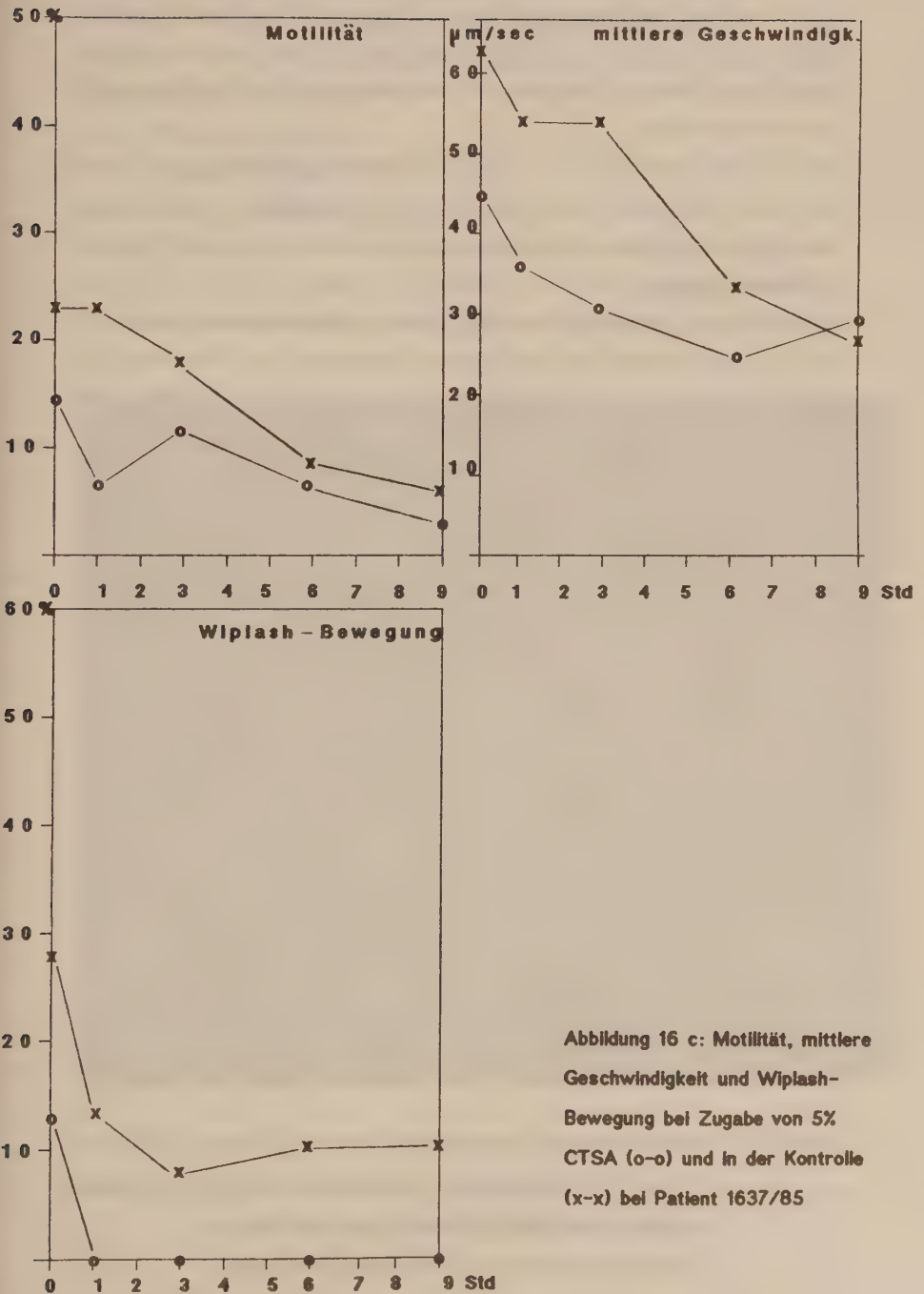


Abbildung 16 c: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung bei Zugabe von 5% CTSA (o-o) und in der Kontrolle (x-x) bei Patient 1637/85

4.3. Die Triple-Stain-Technik

Diese Technik erlaubt die Beurteilung der Morphologie und des Reaktionszustandes eines Spermatozoons .

Unter der Einwirkung von CTSA fiel eine morphologische Veränderung auf, die mit den Spermatozooköpfen vor sich ging. Es kam zu Vergrößerung, Auftreibung und letztendlich wolkenartiger Auflösung des Spermatozookopfes, ab einer Zugabe von 0,5% CTSA (Abbildung 17).

Ein CTSA-Zusatz von 0,0001% rief keine signifikanten Veränderungen hervor .

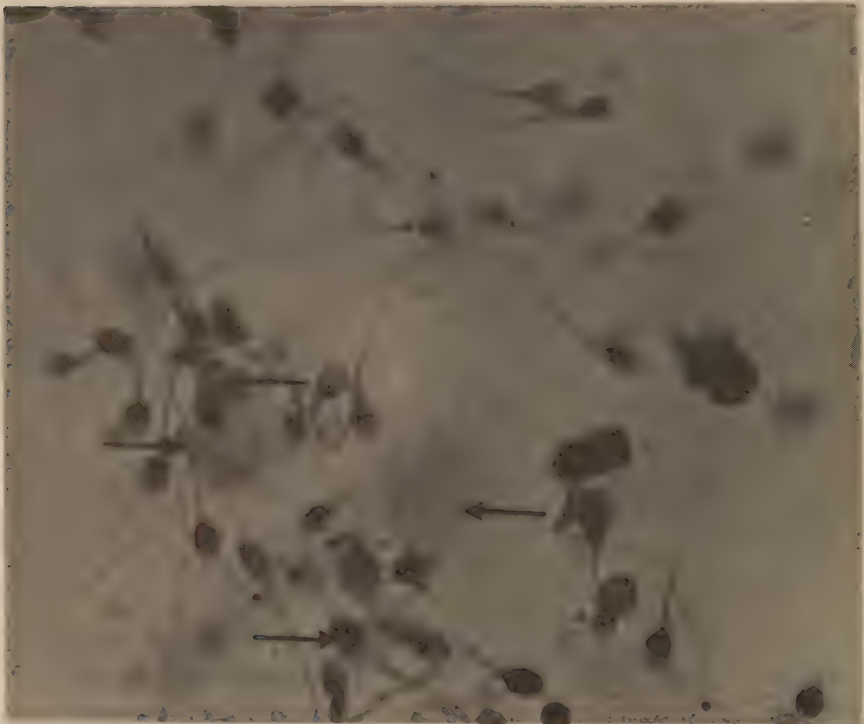


Abbildung 17: Spermatozoen mit Kopfveränderung (→) nach längerer Einwirkungszeit von CTSA (9 Stunden) in Triple-Stain-Technik; der Prozentsatz der geschädigten Spermatozoen ist jedoch niedrig. Die meisten Spermatozoen sind morphologisch intakt.

Abbildung 18 zeigt die Durchschnittswerte der Kontrollen (n=10).

Abbildung 19 stellt an Beispielen die Zunahme der Kopfveränderungen bei CTSA-Zugabe von a) 0,5% (Patient 1753/84)

b) 1,7% (Patient 1028/84)

c) 5% (Patient 1686/84)

und die jeweils zugehörige Kontrolle dar.

Diese pathologischen Veränderungen, die zum Absterben des Spermatozoons führen, nahmen über die Versuchsdauer von neun Stunden zu. Da selbst nach neun Stunden aber maximal 20% der Spermatozoen betroffen sind, kommt diesem Effekt von CTSA keine große Bedeutung zu.

Spermatozoen (%)

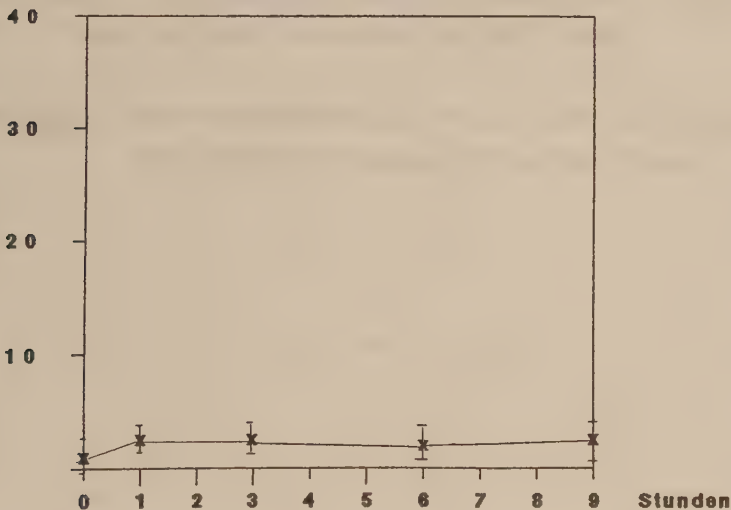


Abbildung 18: Durchschnittswerte der speziellen Kopfveränderungen in den Kontrollproben (n = 10) bei Anwendung der Triple-Stain-Technik

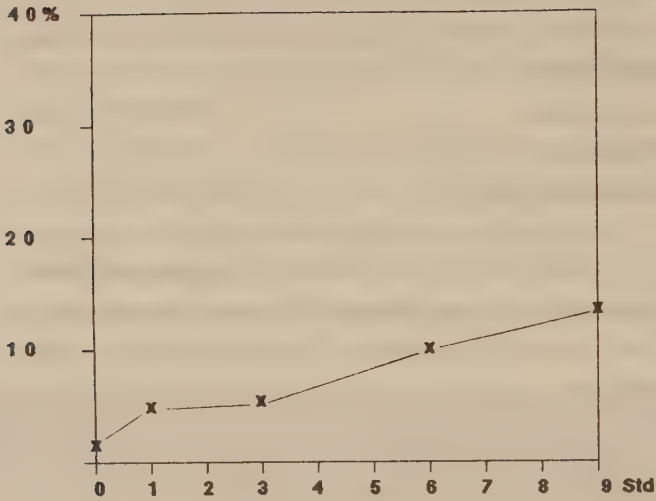


Abbildung 19 a: Spezielle Kopfveränderungen bei Zugabe von 0,5% CTSA am Beispiel Patient 1753/84 bei Anwendung der Triple-Stain-Technik

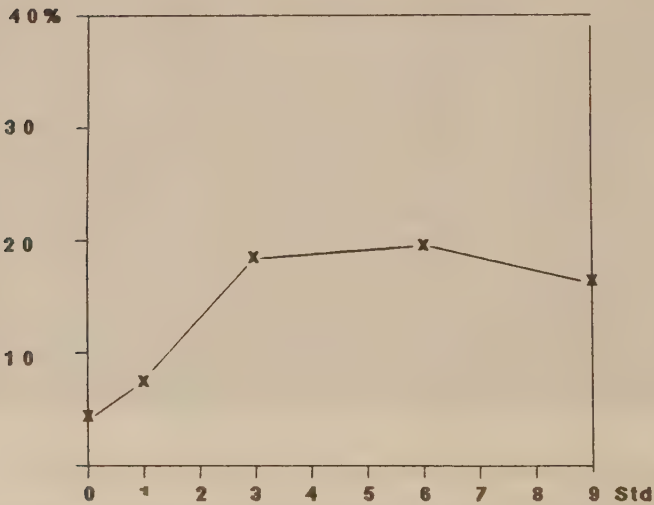


Abbildung 19 b: Spezielle Kopfveränderungen bei Zugabe von 1,7% CTSA am Beispiel Patient 1028/84 bei Anwendung der Triple-Stain-Technik

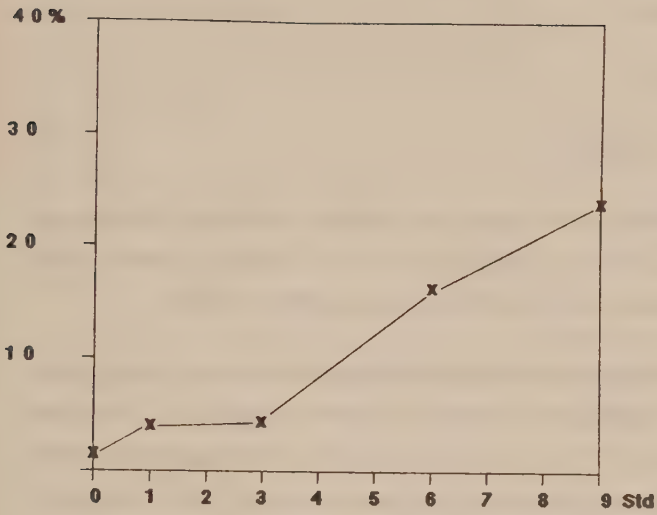


Abbildung 19 c: Spezielle Kopfveränderungen bei Zugabe von 5% CTSA am Beispiel
Patient 1686/84 bei Anwendung der Triple-Stain-Technik

5. DISKUSSION

5.1. Allgemeines

5.1.1. Spermatozoenmigration

Damit eine Eizelle befruchtet werden kann, müssen Hunderte von Spermatozoen einen langen Weg durch den weiblichen Genitaltrakt zurücklegen. Hierbei erfahren sie die Veränderungen, die erst zu ihrer Befruchtungsfähigkeit führen.

Unter normalen Bedingungen werden 200-500 Millionen Spermatozoen bei der Kohabitation im hinteren Vaginalgewölbe deponiert. Der größte Teil geht durch den vaginalen Reflux verloren oder wird durch die Einwirkung des sauren Vaginalmilieus immobilisiert. Befindet sich der Cervixmucus in der präovulatorischen Phase, erlaubt er den intakten Spermatozoen die Penetration. Die Aufnahmefähigkeit des Cervixschleims besteht von der zweiten Hälfte der Proliferationsphase an bis circa zwei Tage nach der Ovulation. Das Optimum liegt am Tag vor der Ovulation und am Tag der Ovulation. Für die aufsteigenden Spermatozoen wirkt der Cervikalmucus als Filter. Durch die Netzbildung der Muzinfilamente werden morphologisch atypisch geformte Spermatozoen an der weiteren Aszension gehindert oder zumindest in ihrer Migrationsgeschwindigkeit entscheidend gehemmt (14).

Der Glukosegehalt des Cervikalmucus dient als Energiequelle für die Spermatozoen und ermöglicht ihre weitere Migration. Im Cervikalschleim zeigen die Spermatozoen weitgehend ein lineares Bewegungsmuster; die Häufigkeit der Schwanzschläge ist gesteigert (50).

Sobald die Spermatozoen den Uterus erreichen, beginnen sie, sich dem Prozeß der Kapazitation zu unterziehen. Die Kapazitation beruht, wie heute angenommen wird, auf biochemischen Veränderungen insbesondere der Membran des Spermatozoons und ist Voraussetzung für die Akrosomreaktion und die Hyperaktivierung (61).

Die bisher bekannten biochemischen Veränderungen bestehen in der Entfernung von, aus dem Seminalplasma stammenden, der Spermatozoenoberfläche anhaftenden Komponenten, die eine Fertilisierung verhindern würden. Bereits kapazitierte Spermatozoen können durch Inkubation in Seminalplasma wieder zur Befruchtung unfähig gemacht (= dekapazitiert) werden (61).

Die Gruppe der oberflächenaktiven Substanzen wird seit langem zu kontrazeptiven Zwecken verwendet und findet sich weltweit in vielen Präparaten.

Die nicht-ionische Verbindung Nonoxinol-9 ist der bedeutendste Vertreter und gehört zu den wirksamsten Spermiziden .

Viele Untersuchungen, die mit Nonoxinol-9 als Reinstoff oder mit dem Vaginalovulum Patentex oval durchgeführt wurden, bestätigen die spermizide Wirksamkeit (9, 39, 72, 76).

Als Parameter für den Spermizid-Nachweis eignet sich die Beobachtung von Motilitätsveränderungen, morphologischen Schädigungen und Akrosinfreisetzung.

Eine Reduktion der Oberflächenspannung und die direkte Einwirkung auf die Zellmembran der Spermatozoen führen zu einer Immobilisierung und Abtötung der Spermatozoen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ultrastruktur zeigen einen generalisierten Membranverlust (82). Messungen der Freisetzung und der Aktivität von Akrosin beweisen den Austritt des akrosomalen Enzyms und die Hemmung seiner Aktivität (63).

5.1.3. Cellulosetrischwefelsäureester, der deklarierte Wirkstoff des Vaginalovulums a-gen 53

Die Überprüfung der Parameter Motilitätsänderung, morphologische Schädigungen und Akrosinfreisetzung schien auch geeignet, die Substanz Cellulosetrischwefelsäureester (CTSA), eine Polysaccharidverbindung auf seine spermizide Wirksamkeit zu testen. Nach den Angaben des Herstellers Dr. Herbrand KG, Gengenbach zur Wirkweise dieser Substanz müßte CTSA in die Gruppe der Enzyminhibitoren eingeordnet werden. Demnach soll CTSA kein oberflächenaktives Spermizid, sondern ein irreversibler Enzymhemmer sein. Die Hemmung der Hyaluronidase in Seminalplasma und Akrosom sollen die Passierbarkeit des Cervikalschleimpfropfes erschweren und die Andauung der *Corona radiata* und damit die Befruchtung verhindern. Die Hemmung der Fruktolyse soll zum sofortigen Verlust der Eigenbeweglichkeit und zum Absterben der Spermatozoen führen.

5.2. Eigene Untersuchungen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit der Reinsubstanz CTSA, in Pulverform von der Firma EGA-Chemie (Steinheim) bezogen, durchgeführt.

Die Beurteilung der Motilitätsänderungen erfolgte mit der Dunkelfeldmethode nach OVERSTREET (66).

Um die Bedingungen eines Spermizids zu erfüllen, müßte CTSA innerhalb 20 Sekunden nach Zugabe zu vollständiger Immobilisierung führen (nach SANDER-CRAMER). Die Endkonzentration, die nach Einführen eines Vaginalovulums a-gen 53 in der Vagina nach Verdünnung durch das Ejakulat und das Vaginalsekret erreicht wird, beläuft sich auf 1,7%.

Die Wirkung von CTSA auf das Verhalten der motilen Spermatozoen, auf die Durchschnittsgeschwindigkeit und die Wiplash-Bewegung wurde in Konzentrationen von 0.0001%, 0,5%, 1,7% und 5% erprobt.

Die drei niedrigen Konzentrationen beeinflussten keinen der Parameter. 5% ige CTSA bewirkte zwar ein Absinken der motilen Spermatozoen und eine Hemmung von Geschwindigkeit und Wiplash-Bewegung, aber auch nach neun Stunden Versuchsdauer konnten in allen Fällen noch lebendige, vorwärts bewegliche Spermatozoen nachgewiesen werden.

Die Beurteilung der Spermatozoenmorphologie wurde mit zwei Methoden vorgenommen. Zum einen wurden Spermatozoen mit Antikörpern gegen die äußere akrosomale Membran versetzt und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bewertet. An anderen Ejakulaten erfolgte eine Färbung mit der Triple-Stain-Technik und die Beurteilung mit dem Phasenkontrastmikroskop.

Bei beiden Methoden konnte keine signifikante membranzerstörende Wirkung festgestellt werden.

Die Färbung mit der Triple-Stain-Technik zeigte zwar eine Vergrößerung, Auftreibung und letztendlich Auflösung der Spermatozoenköpfe ab einer Konzentration von 0,5% CTSA. Da selbst nach neun Stunden nur 20% der Spermatozoen von dieser Veränderung betroffen waren, kann diese Wirkung nicht als spermizid gelten.

Auch in der Immunfluoreszenz traten bei längerer Einwirkung von 1% igem CTSA Spermatozoen auf, deren Köpfe vergrößert waren und in der akrosomalen Region keine Fluoreszenz mehr zeigten. Hier belief sich die Anzahl betroffener Spermatozoen nach sechs Stunden auf 28%.

Die Frage der Akrosinfreisetzung wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz beantwortet. Die Konzentration von CTSA belief sich auf 1%. Das Ausmaß der Akrosinfreisetzung wurde an den Diffusionshöfen gemessen, die bei Ablösung des Akrosoms und Austreten des Akrosins in das umgebende Medium entstanden.

In der indirekten Immunfluoreszenz mit α -Akrosin-Antikörpern konnte gezeigt werden, daß während des Ablaufs der Akrosomreaktion die Freisetzung von Akrosin lediglich verzögert, aber nicht gehemmt wird. Die Spermatozoen mit intaktem Akrosom nehmen nur langsam ab, die Zahl der Hofbildungen ist ebenfalls vermindert. Nach sechs Stunden sind noch 50% der Spermatozoen unreaktiert.

Dieser anscheinend auf einer Membranstabilisierung beruhende Effekt ist im Hinblick auf die Befruchtungsfähigkeit eher positiv zu werten, da vorzeitig ablaufende Akrosomreaktionen vermindert werden.

Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden von SCHILL und Mitarbeitern (1985) Untersuchungen mit geschmolzenen Vaginalsuppositorien a-gen 53, mit dem handelsüblichen Wirkstoff CTSA (EGA-Chemie) und mit aus den Suppositorien isoliertem CTSA durchgeführt. Getestet wurden die Parameter Spermatozoenmotilität, Akrosinfreisetzung und Ultrastruktur der Spermatozoen.

5.3. Untersuchungen über die spermizide Wirksamkeit von a-gen 53 und seinem deklarierten Wirkstoff CTSA (SCHILL W.-B. und Mitarbeiter, 1985)

Die Bestimmung der Motilität erfolgte mit dem Phasenkontrastmikroskop. Das geschmolzene Vaginalsuppositorium, das CTSA in einer Endkonzentration von 1,7% enthält, immobilisierte alle Spermatozoen innerhalb von 20 Sekunden.

Der Eosintest wies alle Spermatozoen als devitalisiert aus. Im Sander-Cramer Test (77) konnte eine vollständige Immobilisation innerhalb weniger als 30 Sekunden bis zu einer

CTSA-Konzentration von 0,4% erreicht werden.

Handelsübliches reines CTSA immobilisierte erst bei einer Konzentration von 10%, dabei waren im Eosintest noch 20% der Spermatozoen lebensfähig. Bei der Konzentration von 1%, die ungefähr der Endkonzentration in der Vagina entspricht, konnten noch nach vier Stunden bewegliche Spermatozoen gefunden werden.

Das aus den Vaginalovula isolierte CTSA zeigte bei Konzentrationen bis zu 2% im Sander-Cramer Test innerhalb von zehn Minuten keine Immobilisierung der Spermatozoen. Bei Konzentrationen, wie sie unter vaginalen Bedingungen erreicht werden, erfolgte innerhalb von sechs Stunden keine signifikante Hemmung. Konzentrationen von 5% erreichten eine geringe Hemmung, Konzentrationen von 1% und darunter schienen die Beweglichkeit sogar leicht zu stimulieren.

Nach diesen Ergebnissen hat das isolierte CTSA noch geringere Wirksamkeit auf die Motilität als das handelsübliche.

Akrosinfreisetzung und Akrosinaktivität wurden spektrophotometrisch und mit der Gelatinolysemethode bestimmt.

Die spektrophotometrische Bestimmung war wegen Trübungseffekten erst ab einer Verdünnung des geschmolzenen Ovulums von 1/16 möglich. Es zeigte sich eine partielle Freisetzung des Enzyms in den Überstand (+122%) und ein Aktivitätsverlust des Akrosins (-16%).

Das handelsübliche CTSA wurde in Konzentrationen von 0,01% bis 1% ausgetestet. Im Vergleich zu den Kontrollproben wurde weder eine Aktivitätsminderung noch eine Akrosinfreisetzung in den Überstand beobachtet.

Die Bestimmung der Akrosinaktivität mit der Gelatinolysemethode erbrachte bei Testung des geschmolzenen a-gen 53 in Verdünnungen von 1:16 bis 1:1 nach 10-minütiger Einwirkung einen vollständigen Verlust der Lysishöfe, was auf eine totale Freisetzung von Akrosin während der Inkubationsphase hindeutet.

Die Inkubation der Spermatozoen mit handelsüblichem CTSA zeigte keine Einwirkung auf die Lysishöfe.

Die Beurteilung der Ultrastruktur der Spermatozoen erfolgte elektronenmikroskopisch. Das geschmolzene Ovulum mit einer CTSA-Endkonzentration von 1,7% führte zu massiven Veränderungen der Membranstrukturen: vollständige Ablösung der Plasmamembran, größtenteils ein Fehlen der akrosomalen Membranen, Zeichen von Kerndekondensation, Fehlen der Cristae in den Mitochondrien.

Gleiche Untersuchungen von handelsüblichem und isoliertem CTSA, jeweils in der Konzentration von 1,7%, zeigten keinerlei Veränderungen der Ultrastruktur; die Plasmamembran ist erhalten, die akrosomalen Membranen sind intakt. Es zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe.

5.4. Schlußfolgerung

Nach den eigenen Ergebnissen, die mit handelsüblichem CTSA durchgeführt wurden, läßt sich bereits die Frage nach der Spermizidität dieser Substanz beantworten.

Selbst in Konzentrationen, die dreimal höher sind als die üblicherweise in der Vagina erreichten, besteht keine signifikant negative Wirkung auf Motilität, Morphologie oder Akrosinfreisetzung.

Da die in großer Zahl durchgeführten klinischen Studien (26, 31, 36, 43) eine kontrazeptive Wirksamkeit des Vaginalovulums a-gen 53 bestätigen und die spermizide Wirkung nachweislich nicht von CTSA ausgehen kann, muß die Spermizide von a-gen 53 in den Trägerstoffen des Ovulums zu suchen sein.

Diese Vermutung wird durch die von SCHILL (83,84) durchgeführten Vergleichsuntersuchungen von geschmolzenem a-gen 53, handelsüblichem und aus den Ovula isoliertem CTSA hinreichend bestätigt.

Das geschmolzene Vaginalsuppositorium führte im Sander-Cramer-Test (77) zu sofortiger Immobilisation aller Spermatozoen. Der Eosintest zeigte nur tote Spermatozoen. Daraus kann gefolgert werden, daß die Immobilisierung auf Abtötung der Spermatozoen beruht und nicht auf einer Hemmung der Fruktoolyse. Bestätigt wird diese Erkenntnis auch durch die Untersuchungen der Ultrastruktur, die einen völligen Membranverlust aufzeigten.

Vergleicht man die Wirkungsweise von a-gen 53 mit den Auswirkungen einer Nonoxinol-Behandlung auf die Spermatozoen (siehe 2.3.3.1.), wird die Ähnlichkeit der erzielten Resultate deutlich.

Bei beiden Stoffen resultiert Plasmamembranverlust, Zerstörung des akrosomalen Membrankomplexes, Kerndekondensation und Mitochondrienschädigung. Damit ergibt sich kein Unterschied in der Wirkweise von a-gen 53 zu üblichen oberflächenaktiven Spermiziden.

Dagegen zeigten die Untersuchungen an handelsüblichem und isoliertem CTSA keinerlei Effekte auf die angewendeten Parameter.

Die vom Hersteller angegebene Hemmung der Hyaluronidase trifft zwar auf das isolierte Enzym zu (84), eine intraakrosomale Hemmung der Penetrationsenzyme dürfte aber an der Undurchlässigkeit der akrosomalen Membranen für höhermolekulare Stoffe scheitern. Immerhin hat CTSA ein Molekulargewicht zwischen 68 und 2000 kdal.

Für die fehlende Penetrationsfähigkeit von CTSA sprachen auch Untersuchungen zur Resorption von CTSA an der Kaninchenvagina. Zur Prüfung der Resorbierbarkeit von CTSA wurden Versuche mit der radioaktiv markierten Substanz durchgeführt. Die Resorption des Stoffs durch die Vaginalschleimhaut von Kaninchen erfolgte nur zu 5% und wurde hauptsächlich von dem geringen Anteil anorganischen Schwefels in CTSA gestellt (98).

Nachdem die Insuffizienz des angeblichen Wirkstoffs CTSA als Enzymhemmer und als herkömmliches Spermizid nachgewiesen wurde, bleibt zu klären, worauf die spermizide Wirkung des Vaginalovulums a-gen 53 beruht. Sind die Trägerstoffe als solche bereits spermizid oder wurden andere, nicht deklarierte spermizide Substanzen zugesetzt?

Diese Untersuchungen und die Tatsache, daß Herbrand auch Vaginalsuppositorien (unter dem Namen "Herbrand") herstellt, die neben CTSA zusätzlich Nonoxinol-9 als deklarierten Wirkstoff enthalten, gaben Anlaß, eine analytische Prüfung von a-gen 53 durch das Deutsche Arzneiprüfungsinstitut vorzunehmen (90). Die Analyse im UV-Spektrum zeigte die Identität einer aus den Vaginalovula isolierten Substanz mit einer Nonoxinol-9 Vergleichsprobe. Die Konzentration dieser Substanz betrug 220 mg pro Zäpfchen und entspricht der Konzentration von Nonoxinol-9 in einem "Herbrand"-Suppositorium. Zu einer Stellungnahme gefordert, bestritt der Hersteller die Verwendung anderer Spermizide und versteifte sich auf den Polysaccharid-Polyschwefelsäureester als einzigen Wirkstoff. Das UV-Spektrum würde dem Hilfsstoff und Emulgator "Antarox - CO-630", von der Firma GAF GmbH/Frechen bezogen, entsprechen. Eine Analyse dieses "Antarox CO- 630" wies den angeblichen Hilfsstoff als reines Nonoxinol-9 aus.

Die Spermizidie des Vaginalovulums a-gen 53 ist damit hinreichend erklärt. In der Folge wurde das Präparat a-gen 53 für einige Zeit aus dem Handel gezogen. Inzwischen sind die Vaginalzäpfchen unter der Bezeichnung a-gen 53 n wieder erhältlich. Als Zusammensetzung eines Vaginalovulums wird angegeben: 0,10 g Cellulose-trischwefelsäureester (Natriumsalz), 0,23 g Nonoxinol-9.

Die Angaben zur Wirkungsweise in der Gebrauchsinformation sind sehr vage gehalten. "a-gen 53 macht die männlichen Samenzellen befruchtungsunfähig und verhindert das Eindringen der Samenzellen in die Gebärmutter bzw. in die Eizelle".

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unter den kontrazeptiven Methoden gewinnt die lokale, intravaginale Verhütung auf chemischer Grundlage wegen ihrer leichten Anwendbarkeit und ihrer Unschädlichkeit für den gesamten Organismus immer mehr an Bedeutung.

Substanzen, die zu Immobilisierung und Absterben der Spermatozoen in der Vagina führen, werden als Spermizide bezeichnet. Ihre Wirkweisen sind vielfältig. Am bekanntesten ist das oberflächenaktive Nonoxinol, das membranzerstörend und dadurch devitalisierend wirkt.

Auf der Basis eines Enzymhemmers (Hyaluronidasehemmung im Akrosom, Fruktolysehemmung) sollte hingegen die Substanz Natrium-Cellulosetrisulfat (CTSA), deklarierter Wirkstoff des Vaginalovulums a-gen 53, laut Angaben des Herstellers wirken.

Aufgrund des großen Molekulargewichts von 68 bis 2000 kdal traten Zweifel an der Intraakrosomalen Hemmwirkung auf. Daher wurden spezielle Untersuchungen durchgeführt, um die angegebene Wirkweise von CTSA zu prüfen und generell die Spermizidität der Substanz zu testen.

Untersucht wurde CTSA in Konzentrationen von 0,0001%, 0,5%, 1,7% und 5%, wobei die Inkubationszeiten bis zu 9 Stunden betrugen. Dabei entspricht die Konzentration von 1,7% der Konzentration von CTSA, die nach dem Schmelzen eines Vaginalovulums und seiner Verdünnung mit vaginalen Sekreten und dem Ejakulat normalerweise in der Vagina vorherrscht. Als Maß für die spermizide Wirkung schien die Beeinflussung der Parameter Motilität, morphologische Beschaffenheit und Akrosinfreisetzung geeignet.

Die Beurteilung der Motilität erfolgte mit Hilfe der Dunkelfeldmethode nach OVERSTREET et al. (1979) und umfasste die Anzahl der vorwärts beweglichen Spermatozoen, ihre mittlere Geschwindigkeit und das Ausmaß der Wiplash-Bewegung. Bei der Untersuchung dieser Parameter konnte für CTSA-Konzentrationen von 0,0001%, 0,5% und 1,7% eine signifikante Wirkung nicht nachgewiesen werden. Erst ein CTSA-Zusatz in Höhe von 5% zeigte eine signifikante Beeinflussung: die vorwärts beweglichen Spermatozoen verringerten sich im Vergleich zur Kontrolle schneller

und hatten nach Versuchsablauf wesentlich niedrigere Werte erreicht. Ebenso konnte eine deutliche Hemmung der mittleren Geschwindigkeit und der Wiplash-Bewegung festgestellt werden. Die Wiplash-Bewegung trat nach spätestens sechs Stunden nicht mehr auf. Trotz der teils erheblichen Motilitätsminderung zu Versuchsbeginn ließen sich in allen Fällen auch nach neun Stunden noch lebendige, vorwärts bewegliche Spermatozoen nachweisen.

Die Morphologie der Spermatozoen wurde mit der Triple-Stain-Technik nach TALBOT und CHACON (1981) und der indirekten Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen die äußere akrosomale Membran beurteilt.

In der Triple-Stain-Technik zeigte sich bei einem CTSA-Zusatz von 0.0001% keine signifikante Veränderung. Bei steigenden CTSA-Konzentrationen von 0,5%, 1,7% und 5% traten mit zunehmender Inkubationsdauer Vergrößerung, Auftreibung und wolkenartige Auflösung der Spermatozooköpfe auf. Jedoch blieben diese Veränderungen auch bei einer Inkubationszeit von neun Stunden auf maximal 20% der Spermatozoen beschränkt.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Wirkung von 1% iger CTSA-Zugabe auf die äußere akrosomale Membran der Spermatozoen getestet. Dabei traten morphologische Veränderungen auf, die den bei der Triple-Stain-Technik wahrgenommenen Anomalitäten entsprachen. Das Maximum der deformierten Spermatozoen belief sich bei Versuchsende auf ca. 28%.

Die Untersuchung der Akrosinfreisetzung wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz bei Zugabe von α -Akrosin-Antikörpern durchgeführt. Im Gegensatz zur Kontrollprobe wurde die Akrosinfreisetzung durch 1%iges CTSA zwar signifikant verzögert, aber keineswegs ganz gehemmt. Die Zahl der Diffusionshöfe war zwar vermindert, jedoch nach sechs Stunden Versuchsdauer waren noch 50% der Spermatozoen unreaigiert. CTSA scheint hier die akrosomalen Membranen zu stabilisieren.

Diesen Untersuchungen zufolge hat die Substanz Natrium-Cellulose-trischwefelsäure-ester keine signifikante Wirkung auf die Parameter Spermatozoenmotilität, Spermatozoenmorphologie und Akrosin-freisetzung. Selbst in hohen Konzentrationen (dreimal höher als die üblicherweise nach Schmelzen eines Ovulums in der Vagina erreichten) und nach langen Einwirkzeiten (bis zu neun Stunden) ist die Beeinflussung der Spermatozoenparameter nur gering. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine vollständige Immobilisierung der Spermatozoen nachgewiesen werden.

Nach diesen Ergebnissen kann Natrium-Cellulose-trischwefelsäure-ester, der deklarierte Wirkstoff des Vaginalovulums a-gen 53 nicht zu den Spermiziden gerechnet werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AITKEN R. J., FIONA S. M., RICHARDSON D. W., DJAHANBAKHCH O., LEES M. M. (1982)
The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men
Fert. Ster. 38: 68-76
2. AUSTIN C. R. (1952)
The "capacitation" of mammalian sperm
Nature 170: 326
3. AUSTIN C. R., BISHOP M. W. H. (1958)
Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization
Proc. Roy. Soc. B. 149: 241-248
4. BARROS C., GONZALEZ J., HERRERA E., BUSTOS-OBREGON E. (1979)
Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability
Andrologia 11: 197-210
5. BEDFORD J. M. (1969)
Morphological aspects of sperm capacitation in mammals
Adv. Biosci. 4: 35-50
6. BEDFORD J. M. (1970)
Sperm capacitation and fertilization in mammals
Biol. Reprod. (Suppl.) 2: 128-158
7. BEDFORD J. M. (1983)
Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals
Biol. Reprod. 28: 108-120

8. BLACK C., HOUGHTON V. P. (1983)
An user acceptability study of vaginal spermicides in combination with barrier methods or an IUCD
Contraception 28: 103-110
9. BREHM H., ALBRECHT I. (1972)
Untersuchungen zur lokalen Kontrazeption
Med. Welt 23: 865-867
10. BREHM H., HAASE W. (1975)
Die Alternative zur hormonalen Kontrazeption?
Med. Welt 26: 1610-1617
11. BUCHNER P., HERBRAND W., RÖCKL W. (1953)
Über eine neue kontrazeptionelle Methode auf biologischer Grundlage
Dtsch. Med. Wochenschrift 78: 907-911
12. BURCK P.J., ZIMMERMANN R.E. (1984)
An intravaginal contraceptive device for the delivery of an acrosin and hyaluronidase inhibitor
Fert. Ster. 41: 314-318
13. CHANG, M. C. (1984)
The meaning of sperm capacitation
J. Androl. 5: 45-50
14. CHRETIEN F.C. (1977)
Technical problems involved in scanning electron microscopic observation of cervical mucus framework
in: Insler/Bettendorf "The uterine cervix in reproduction"
Thieme Verlag Stuttgart, pp. 44-52

15. COONS A. H. (1961)
The beginning of immunofluorescence
J. Immunol. 87: 499-503
16. COONS A.H., KAPLAN M.H. (1950)
Lokalizaton of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the
detection of antigen by means of fluorescent antibody
J. Exp. Med. 91: 1-13
17. COONS A.H., CREECH H.J., JONES R.N. (1941)
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 47: 200-202
18. COONS A.H., CREECH H.J., JONES R.N., BERLINER E. (1942)
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of
fluorescent antibody
J. Immunol. 45: 159-170
19. CRAIG S., HEPBURN S. (1982)
The effectiveness of barrier methods of contraception with and without
spermicide
Contraception 26: 351- 359
20. CROZET N., DUMONT M. (1984)
The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep
oocyte
Gamete Res. 10: 97-105
21. CUMMINS J.M. (1982)
Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the
oviducts of mated ewes
Gamete Res. 6: 53-63

22. DEUTSCHE CHEFARO PHARMA GMBH
Ärzte-Mailing: a-gen 53 Zuverlässiges lokales Kontrazeptivum mit einmaligem Wirkungsmechanismus
23. DEUTSCHE CHEFARO PHARMA GMBH
Basisbroschüre: Basisinformation a-gen 53 Zuverlässiges lokales Kontrazeptivum mit einmaligem Wirkungsmechanismus
24. DEUTSCHE CHEFARO PHARMA GMBH
"Das kontrazeptive Vaginal-Suppositorium" Ergebnisse einer klinischen Fünfjahres-Studie von Dr. med. N. Florence, Brüssel
25. DINGLE J.T., TIETZE C. (1963)
Comparative study of three contraceptive methods: vaginal foam tablets, jelly alone, and diaphragm with jelly or cream
Am. J. Obstet. Gynec. 85: 1012-1022
26. DÖRING G.K. (1954)
Practical experience with a new vaginal contraceptive
In: The International Journal of sexology, Vol. 7 : 93-94
27. DÖRING G.K. (1983)
"Empfängnisverhütung", pp. 53-59, 116-118, 135-147
Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
28. DRAVLAND E., MEIZEL S. (1981)
Stimulation of hamster sperm capacitation and acrosome reaction in vitro by Glucose and Lactate and inhibition by the glycolytic inhibitor α -Chlorohydrin
Gamete Res. 4: 515-523
29. EDELMAN D. (1984)
Vaginal contraception: an overview
Int. J. Gynaecol. Obstet. 22: 11-17

30. FAHRLÄNDER M., MALL-HAEFELI M. (1979)
Das Schaum-Ovulum, eine Alternative zur Pille?
Sexualmedizin 8: 113-114
31. FLORENCE N. (1977)
Das kontrazeptive Vaginal-Suppositorium
Sexualmedizin 5: 385-386
32. FRASER L. R. (1982)
 Ca^{++} is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro
J. Androl. 3: 412-419
33. FRENKEL D.A. (1961)
Sperm migration and survival in the endometrial cavity
Int. J. Fert. 6: 285-290
34. FRITZ H., FINK E., MARX R. (1971)
Ansatzpunkte für eine antienzymatische Kontrazeption
in: Marx R., Thies H.A. "Sexualhormone und Blutgerinnung", pp. 35-49
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart · New York
35. GLATTHAAR E., BENZ J. (1981)
"Checkliste Gynäkologie", pp. 220-221
Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
36. GODTS P. (1973)
Klinische Prüfung eines vaginalen Antikonzipiens (Natr. Cellulos. Trisulfur.)
Ars Medici 28: 584-593
37. HABENICHT U.-F. (1987)
Akrosin - ein bedeutendes Enzym für die Fertilisation
Fertilität 3: 7-11

38. HARDY N.R., WOOD C. (1972)
Vaginal contraception
in: Potts M., Wood C. "New concepts in contraception"
Baltimore, pp. 103-123
39. HAUSER G. (1979)
Das Schaumovulum im Postkoitaltest
Sexualmedizin 8: 112-113
40. HAUSER G. (1986)
Mechanische und chemische lokale Kontrazeption, Coitus interruptus
Ther. Umschau 43: 404-410
41. HERBRAND W. (1953)
Über eine neue kontrazeptionelle Methode auf biologischer Grundlage
Sonderdruck aus dem Hormonforschungslaborium Dr. W. Herbrand
Gengenbach/Baden
42. HERBRAND W. (1954)
Der Fermentmechanismus beim Konzeptionsvorgang und dessen
Nutzbarmachung zur Verhütung kontraindizierter Schwangerschaften
Sonderdruck aus "Taschenbuch der prophylaktischen Medizin", pp. 334-339
Hrsg. Berghoff E., Gerfeldt E. Im KARL F. HAUG VERLAG ULM·DONAU
43. HILDEBRANDT A. (1956)
Praktische Erfahrungen mit einem fermentchemischen Antikonzipiens
Med. Klinik 51: 1192
44. HUANG T.T.F., FLEMING A.D., YANAGIMACHI R. (1981)
Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida:
a study using the guinea pig
J. Exp. Zool. 217: 287-290

45. JEKER P., MALL-HAEFELI M. (1986)
Vaginale Kontrazeption mit Today- und Benzaltex-Tampons
Ther. Umsch. 43(5): 411-416

46. KAISER R., SCHUMACHER G. F.B. (1981)
"Menschliche Fortpflanzung", pp. 70-105, 113-125, 315-362
Thieme Verlag Stuttgart·New York

47. KAMIDONO S., HAZAMA M., MATSUMOTO O., TAKADA K., TOMIOKA O.,
ISHIGAMI J. (1983)
Study on human spermatozoal motility: preliminary report on newly developed
multiple exposure photography method
Andrologia 15: 111-119

48. KAMINSKY J.M., NUZZO N.A., BAUER L., WALLER D.P., ZANEVELD L.J.D.,
(1985)
Vaginal contraceptive activity of aryl 4-guanidinobenzoates (acrosin inhibitors)
in rabbits
Contraception 32: 183-189

49. KATZ D. F., YANAGIMACHI R. (1980)
Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct
Biol. Reprod. 22: 759-764

50. KATZ D.F., MILLS R.N., PRITCHETT T.R. (1978)
The movement of human spermatozoa in cervical mucus
J. Reprod. Fert. 53: 259-265

51. KATZ D.F., YANAGIMACHI R., DRESDNER R.D. (1978)
Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster
spermatozoa in relation to activation
J. Reprod. Fert. 52: 167-172

52. LAMBERT H. (1981)
Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova
Gamete Res. 4: 525-533
53. LÜNEBURG H. (1894)
Die Gynäkologie des Soranus von Ephesus
J. F. Lehmann's Verlag München, pp. 44-45
54. MAKLER A. (1978 a)
A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination
Fert. Ster. 30: 192-199
55. MAKLER A. (1978 b)
A new chamber for rapid sperm count and motility estimation
Fert. Ster. 30: 313-318
56. MAKLER A. (1980)
Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analysis and for research purposes
Fert. Ster. 33: 160-166
57. MANN T. (1964)
Spermistatic, spermicidal and antispermatogetic substances
in: Mann T. "The biochemistry of semen and of the male reproductive tract"
London, pp. 379-396

58. MASTROIANNI L., HONGSANAND C. (1965)
Mechanism of action of the intra-uterine contraceptive device in the primate.
I: Tubal transport of ova and distribution of spermatozoa
in: Segal S.J., Southam A.L., Shafer K.D. "Intrauterine Contraception"
International Congress Series No. 86
Excerpta Medica Foundation, pp. 194-197
59. MASTROIANNI L., SUZUKI S., MANABE Y., WATSON F. (1967)
Further observations on the influence of the intrauterine device on ovum and
sperm distribution in the monkey
Am. J. Obstet. Gynec. 99: 649-661
60. MONROY A., ROSATI F. (1983)
Review article: a comparative analysis of sperm-egg interaction
Gamete Res. 7: 85-102
61. MOORE K. L. (1985)
"Embryologie", pp. 31-36
Schattauer Verlag Stuttgart · New York
62. MORRIS J. M., WAGENEN G.v., MCCANN T., JACOB D. (1967)
Compounds interfering with ovum
Implantation and development
II. Synthetic estrogens and antiestrogens
Fert. Ster. 18: 18-34
63. MÜLLER-ESTERL W., SCHILL W.-B. (1982)
Sperm acrosin: liberation from the acrosome and activity of the free proteinase
in the presence of nonoxinol-9
Andrologia 14: 309-316

64. MÜLLER-ESTERL W., WENDT V., LEIDL W., DANN O., SHAW E., WAGNER G., FRITZ H. (1983)
Intra-acrosomal inhibition of boar acrosin by synthetic proteinase inhibitors
J. Reprod. Fert. 67: 13-18

65. NEUMANN F. (1984)
Steroidal contraception, experimental background
Abstract No. 1
Contraceptive Delivery Systems 5(3)

66. OVERSTREET J. W., KATZ D. F., HANSON F. W., FONSECA J. R. (1979)
A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics
Fert. Ster. 31: 162-172

67. PERREAULT S. D., ROGERS B. J. (1982)
Capacitation pattern of human spermatozoa
Fert. Ster. 38: 258-260

68. PIKO L., TYLER A. (1964)
Fine structural studies of sperm penetration in the rat
Proc. Vth Int. Cong. Anim. Reprod. and AJ Trento 2: 372-377

69. PLACHOT M., MANDELBAUM J., JUNCA A.-M. (1984)
Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization
Fert. Ster. 42: 418-423

70. POTTS M., MCDEVITT J. (1975)
A use-effectiveness trial of spermicidally lubricated condom
Contraception 11: 701-710

71. RABE T., RUNNEBAUM B. (1982)
"Contraception", pp. 219-223
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York

72. RAMMSTEDT D. (1974)
Klinische und In-vivo-Erfahrungen mit einem neuen lokal anwendbaren
Antikonzipiens
Med. Welt 25: 1127-1128
73. REYES A., CHAVARRIA M.E., ROSADO A. (1980)
Interference with spermatozoa capacitation
in: Cunningham G.R., Schill W.-B., Hafez E.S.E. "Regulation of male fertility"
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague·Boston·London, pp. 135-149
74. RIGGS J.L., SEIWALD R.J., BURCKHALTER J.H., DOWNES C.M., METCALF
T.G. (1958)
Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum
Am. J. Pathol. 34: 1081-1092
75. ROTHE K. (1974)
"Methoden der Empfängnisverhütung", pp. 37-103, 191-193
VEB Gustav Fischer Verlag Jena
76. SALOMON W., HAASE W. (1977)
Intravaginale Kontrazeption
Sexualmedizin 6: 198-202
77. SANDER F.V., Cramer S.D. (1941)
A practical method for testing the spermicidal action of chemical contraceptives
Human Fert. 6: 134-137, 153
78. SCHILL W.-B. (1976)
Biochemie und Funktion des Akrosin und seiner Inhibitoren beim
Fortpflanzungsvorgang mit besonderer Berücksichtigung der klinischen
Bedeutung
in: Proteinase und Proteinase-Inhibitoren beim Menschen
Grosse Verlag Berlin, pp. 1-43

79. SCHILL W.-B. (1980 a)
Aktueller Stand der Konzeption beim Mann
Extracta paediatrica 4: 303-314

80. SCHILL W.-B. (1980 b)
Contraception by acrosomal proteinase inhibitors
in: Cunningham G.R., Schill W.-B., Hafez E.S.E. "Regulation of male fertility"
Martinus Nijhoff, The Hague·Boston·London , pp. 151-163

81. SCHILL W.-B., FRITZ H. (1975)
N α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester splitting activity (Acrosin) in human
spermatozoa and seminal plasma during aging in vitro
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 83-90

82. SCHILL W.-B., WOLFF H.H. (1981)
Ultrastructure of human spermatozoa in the presence of the spermicide
nonoxinol-9 and a vaginal contraceptive containing nonoxinol-9
Andrologia 13 : 42-49

83. SCHILL W.-B., WOLFF H.H. (1984)
Spermicidal action of a polysaccharide-polysulfuric acid ester
Abstract No. 16
Contraceptive Delivery Systems 5(3)

84. SCHILL W.-B., WOLFF H.H., TÖPFER-PETERSEN E. (1985)
Zur spermiziden Wirksamkeit eines kontrazeptiven Vaginalsuppositoriums und
dessen Wirkstoff CTSA, einem Polysaccaridpolyschwefelsäureester
Fertilität 1: 32-40

85. SCHILL W.-B., FEIFEL M., FRITZ H., HAMMERSTEIN J. (1981 a)
Inhibitors of acrosomal proteinase as antifertility agents
A problem of acrosomal membrane permeability
Int. J. Androl. 4: 25-38
86. SCHILL W.-B., HEIMBURGER N., SCHIESSLER H., STOLLA R., FRITZ H.
(1975)
Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma
acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect
immunofluorescent staining technique
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 1473-1476
87. SCHIRREN C. (1982)
"Praktische Andrologie"
Schering AG, 2. Aufl.
88. SCHMIDT-MATTHIESEN H. (1982)
"Gynäkologie und Geburtshilfe", pp. 145-182
F. K. Schattauer Verlag Stuttgart · New York
89. SHAMS-BORHAN G., HARRISON R.A.P. (1981)
Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent
acrosome reaction in ram spermatozoa
Gamete Res. 4: 407-432
90. STEINIGEN M. (1985)
Hilfsstoff oder Wirkstoff?
Pharmazeutische Zeitung : 970
91. SUAREZ S. S., KATZ D.F., OVERSTREET J.W. (1983)
Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa
recovered at the site and time of fertilization
Biol. Reprod. 29: 1277-1287

92. TALBOT P., CHACON R. S. (1981)
A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm
J. Exp. Zool. 215: 201-208
93. TIETZE C., LEWITT S. (1965)
Intra-uterine contraception: effectiveness and acceptability
in: Segal S.J., Southam A.L., Shafer K.D. "Intrauterine Contraception"
International Congress Series No. 86
Excerpta Medica Foundation, pp. 98-110
94. TIETZE C., LEHFELDT H., LIEBMANN H.G. (1953)
The effectiveness of the cervical cap as a contraceptive method
Am. J. Obstet. Gynec. 66: 904-908
95. VICKERY PH.D., GOODPASTURE J.C., BERGSTROM K., WALKER K.A.M.,
OVERSTREET J.W., KATZ D.F. (1983)
Assessment of a new spermicidal agent against ejaculated dog and human spermatozoa in vitro
Fertil. Steril. 40: 231-236
96. WENDT V., LEIDL W., FRITZ H. (1975)
The lysis effect of bull spermatozoa on gelatine substrate film methodical investigations
Hoppe seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 315-323
97. WICK G., BAUDNER S., HERZOG F. (1978)
"Immunofluorescence", pp. 208-248
Die medizinische Verlags-Gesellschaft Marburg/Lahn

98. WOOD S.G., FORREST M.E., JOHN B.A., CHASSEAUD L.F., VAN DE WIEL J.A.C. (1984)
Extent of vaginal absorption of sulphated polysaccharide from a-gen 53 in the rabbit
Contraception 29: 375-383
99. XIAO-HUI D., QI C., WALLER D.P., KAMINSKI J., ZANEFELD L.J.D. (1986)
Comparison of the spermicidal activity and acute toxicity of nonoxynol-9 and agent 741 [alkylphenoxypolyethoxyethanol (10)]
Contraception 33 : 1-5
100. YANAGIMACHI R., PHILLIPS D. M. (1984)
The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo
Gamete Res. 9: 1-19
101. ZANEVELD L.J.D., BEYLER S.A., KIM D.S., BHATTACHARYYA A.K. (1979)
Acrosin inhibitors as vaginal contraceptives in the primate and their acute toxicity
Biol. Reprod. 20: 1045-1054
102. ZIEGELER H. (1960)
Geburtenkontrolle durch A-Gen 53
Med. Welt 41: 2181

8. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. W.-B. Schill möchte ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. rer. nat. Dr. med. habil. E. Töpfer-Petersen, die mir immer mit gutem Rat zur Seite stand.

Auch Fräulein Weiß und Fräulein Spitzauer, die sich vor allem bei praktischen Fragen stets hilfsbereit zeigten und mir die Arbeit im Labor erleichterten, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.

Für die geduldige und tatkräftige Unterstützung bei der schreibtechnischen Ausführung dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei meiner Schwester Karoline und ihrem Ehemann Martin Vollmer.

9. LEBENSLAUF

Am 16. September 1960 wurde ich als erste Tochter des Offiziers Werner Loos und seiner Ehefrau Gunda, geb. Kohl in Schnaittach im Kreis Nürnberger Land geboren.

Ab September 1966 besuchte ich die Grundschule in Amberg. 1970 wechselte ich auf das dortige humanistische Erasmus-Gymnasium, wo ich am 27. Juni 1979 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Ab Oktober 1979 studierte ich Psychologie in Konstanz. Im Mai 1980 wechselte ich nach München und begann an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Medizin.

Im April und Mai 1986 legte ich die mündliche und die schriftliche Prüfung des dritten Staatsexamens ab; am 14. Juli 1986 erhielt ich die Approbation.

12. September 1975

Am 12. September 1975 wurde ich von einem Freund, der Offizier Werner Loh, und einem Freund, der, geb. 1944 in Schwanau an der Elbe, Hamburger Landwirt ist.

Am 12. September 1975 besuchte ich die Gedenkstätte in Hamburg. 1975 wurde ich auf der letzten gemeinsamen Tagung der Gedenkstätten, die am 27. April 1975 als allgemeine Gedenktagung stattfand.

Am 12. September 1975 wurde ich von einem Freund, der Offizier Werner Loh, und einem Freund, der, geb. 1944 in Schwanau an der Elbe, Hamburger Landwirt ist, besucht.

Am 12. September 1975 wurde ich von einem Freund, der Offizier Werner Loh, und einem Freund, der, geb. 1944 in Schwanau an der Elbe, Hamburger Landwirt ist, besucht.

